ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NİSİN, FARKLI TUZLAR, DEPOLAMA SICAKLIĞI VE SÜRESİNİN *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARINA KARŞI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MODELLENMESİ

Esra ŞENTÜRK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

NİSİN, FARKLI TUZLAR, DEPOLAMA SICAKLIĞI VE SÜRESİNİN *LISTERIA MONOCYTOGENES* SUŞLARINA KARŞI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MODELLENMESİ

Esra ŞENTÜRK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA
Eş Danışman: Prof. Dr. Sencer BUZRUL

Bu tez çalışmasında sıvı besiyerindeki *Listeria monocytogenes* suşlarına, nisin, NaCl, KCl ve potasyum sorbatın farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu stres etkileri, farklı sıcaklıklardaki inkübasyon koşullarında araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında suşların MİK değerleri ve gelişme hızları belirlenerek 29 adet *L. monocytogenes* suşundan 3 tanesi seçilmiştir. Suşların farklı nisin ve NaCl konsantrasyonlarında gelişme sınırlarını belirlemek amacıyla sırasıyla 0-50-100-200-400 µg/mL ve %0-1-2-3-4 konsantrasyonları kullanılmıştır. 3 tekerrürlü olarak, 3 $\log_{10}$ ile 6 $\log_{10}$ başlangıç hücre yoğunlukları ile yapılan çalışmada 2 ay boyunca 4-20-37 °C sıcaklıklardaki inkübasyon süresince gelişme/gelişmeme durumu OD ölçümleri ile belirlenmiştir ve bir olasılık modeli oluşturulmuştur. Çalışmanın sonraki aşamasında 3 suş için 6 $\log_{10}$ başlangıç hücre yoğunluğunda %0-1-2-3-4 KCl ile %0-0,05-0,1-0,15-0,2 $C_6H_7KO_2$ konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş ve yine aynı şekilde modelleme yapılmıştır. Kabul edilebilir model performansıyla bu çalışmada geliştirilen modellerin *L. monocytogenes* gelişmesinin kontrolünde ve gelişme olasılıklarının belirlenmesinde faydalı olabileceği belirlenmiştir. Çalışmaların gıda ortamında validasyonunu göstermek amacıyla UHT süt ve ev yapımı et suyu kullanılmıştır. %1,5 KCl veya %0,125 $C_6H_7KO_2$ ilaveli gıda ortamlarında 6 $\log_{10}$ başlangıç suş yoğunluğunda, 25-75-50-250 µg/mL nisin konsantrasyonları ile yapılan çalışmada 2 ay boyunca 8 ve 12 °C sıcaklıklarda inkübasyon süresince haftada bir yapılan koloni sayımlarıyla, gelişme/gelişmeme verileri elde edilmiştir. Validasyon çalışması için oluşturulan 48 kombinasyondan süt için 22'sinde (%46) ve et suyu için 35'inde (%73) doğru tahminler elde edilebilmiştir. Elde edilen bulgular, model geliştirme ve validasyon sonuçları göstermektedir ki olasılık modeli kullanarak *Listeria*'nın gelişmesinin hızlı ve doğru tahmini yapılabilir.

Haziran 2023, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*, nisin, tuzlar, matematiksel modelleme, büyüme, inaktivasyon, UHT süt

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF AND MODELING THE EFFECTS OF NISIN, DIFFERENT SALTS, STORAGE TEMPERATURE AND TIME AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS

Esra ŞENTÜRK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Pınar ŞANLIBABA
Co-Supervisor: Prof. Dr. Sencer BUZRUL

In this thesis, the stress effects of different concentrations of nisin, NaCl, KCl and potassium sorbate on *Listeria monocytogenes* strains were investigated under incubation conditions at different temperatures. In the first stage of the study, MIC values and growth rates of the strains were determined and 3 of 29 *L. monocytogenes* strains were selected. Concentrations of 0-50-100-200-400 µg/mL and 0-1-2-3-4% were used to determine the growth boundaries of the strains at different nisin and NaCl concentrations, respectively. In the study performed with 3 replications, with initial cell densities of 3 $\log_{10}$ and 6 $\log_{10}$, the growth/no-growth status was determined by OD measurements during the incubation period at 4-20-37 °C for 2 months and a probability model was created. In the next stage of the study, the effects of 0-1-2-3-4% KCl and 0-0.05-0.1-0.15-0.2% $C_6H_7KO_2$ concentrations at 6 $\log_{10}$ initial cell density were investigated for 3 strains and modeling was done in the same way. It has been determined that the models developed in this study with acceptable model performance could be useful in controlling the growth of *L. monocytogenes* and determining the growth possibilities. UHT milk and homemade meat water were used to demonstrate the validation of the studies in the food environment. In the study conducted with nisin concentrations of 25-75-150-250 µg/mL, at 6 $\log_{10}$ initial strain density in food media with the addition of 1.5% KCl or 0.125% $C_6H_7KO_2$, with colony counts made once a week during incubation at 8 and 12 °C for 2 months, growth/no-growth data were obtained. Of the 48 combinations created for the validation study, accurate estimates could be obtained in 22 (46%) for milk and 35 (73%) for meat water. The findings, model development and validation results show that rapid and accurate estimation of the growth of *Listeria* can be made using the probability model.

June 2023, 95 pages

Key Words: *Listeria monocytogenes*, nisin, salts, mathematical modeling, growth, inactivation, UHT milk

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca her konuda değerli bilgi ve desteğiyle beni yönlendiren ve yanımda olan sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı);

Tez konumun şekillenmesinde ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her konuda yardımcı ve destek olan değerli eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sencer BUZRUL'a (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü);

Değerli görüşleriyle tezimi yönlendiren tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü);

Tez çalışmam için bana laboratuvarın imkanlarını sunan ve her konuda bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Başar KARACA'ya (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü);

Doktoranın tüm zorluklarını birlikte geçirdiğim sevgili arkadaşım Dr. Simge AKTOP'a, laboratuvarda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Dr. Hacer ASLAN'a ve Gıda Yük. Müh. Zehra Tuğçe TOPRAK ÖNAL'a, laboratuvar çalışmalarıma renk katan sevgili arkadaşım Gıda Yük. Müh. Gülsüm ATASOY'a, doktora tez çalışmalarım boyunca bıkmadan her zaman yardımcı ve destek olan sevgili arkadaşım Gıda Yük. Müh. Seda SEYİRT'e;

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, aldığım her kararımda her zaman yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren ve doktora yapmam konusunda beni destekleyen sevgili aileme; sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim sırasında 100/2000 YÖK Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı kapsamında desteklerinden dolayı Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Esra ŞENTÜRK
Ankara, Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ **4**
2.1 *Listeria* spp. ve Genel Özellikleri **4**
2.2 *Listeria monocytogenes* ve Genel Özellikleri **7**
2.3 Listeriozis **9**
2.4 Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Riski **10**
2.5 Gıdalarda *Listeria monocytogenes*'in Biyokontrolü **13**
2.5.1 Bakteriyosinler **14**
2.5.1.1 Nisin **16**
2.6 *Listeria monocytogenes*'in Nisin ile Biyokontrolü **18**
2.7 Biyokontrol Uygulamalarında Engeller Teknolojisinin Kullanımı **19**
2.8 Matematiksel Modelleme **21**
2.8.1 Model geliştirme **26**
2.8.1.1 Modifiye Gompertz modeli **26**
2.8.1.2 Baranyi modeli **27**
2.8.1.3 Üç Fazlı Doğrusal model **27**
2.8.1.4 Lojistik regresyon **27**
2.8.2 Gelişme değerlendirmesi **28**
2.8.3 Model performansının değerlendirilmesi **29**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **32**
3.1 Materyal **32**
3.1.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar **32**
3.2 Yöntem **33**
3.2.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması **33**
3.2.2 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi **33**
3.2.3 Deney tasarımı **35**
3.2.3.1 *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme hızlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı **35**
3.2.3.2 Farklı stres faktörlerine bağlı olarak *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı **36**
3.2.3.2.1 Farklı sıcaklık ve nisin konsantrasyonlarında gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı **37**
3.2.3.2.2 Farklı sıcaklık, NaCl, nisin ve başlangıç inokülüm değerlerinde *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı **38**

3.2.3.2.3 Farklı sıcaklık, KCl ve nisin konsantrasyonlarında *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı 38
3.2.3.2.4 Farklı sıcaklık, $C_6H_7KO_2$ ve nisin konsantrasyonlarında *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı 39
3.2.3.2.5 Gıda ortamı olarak süt ve et suyunda gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı 39
3.2.3.3 Gelişme değerlendirmesi 40
3.2.3.4 Model geliştirme 41
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 43
4.1 MİK Değerleri 43
4.2 *Listeria monocytogenes* Suşlarının Gelişme Hızlarının Tespiti 45
4.3 *Listeria monocytogenes* Suşlarının Sıvı Besiyerindeki Gelişmesi Üzerine Sıcaklık, NaCl, Nisin ve Başlangıç İnokülüm Değerlerinin Etkileri 52
4.4 Sıcaklık, KCl, Nisin ve Suş Tipinin Sıvı Besiyerinde *Listeria monocytogenes*'in Gelişmesi Üzerindeki Etkileri 66
4.5 Sıcaklık, $C_6H_7KO_2$, Nisin ve Suş Tipinin Sıvı Besiyerinde *Listeria monocytogenes*'in Gelişmesi Üzerindeki Etkileri 70
4.6 Gıda Ortamında Modellerin Validasyon Çalışması 74
5. SONUÇ 76
KAYNAKLAR 80
ÖZGEÇMİŞ 91

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
a_w	Su aktivitesi
C	Sitozin
$C_6H_7KO_2$	Potasyum Sorbat
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
G	Guanin
h	Saat
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KOB	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
Log	Logaritma
Mb	Megabaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Normalite
NaCl	Sodyum Klorür
$NaNO_2$	Sodyum Nitrit
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
s	Saniye

Kısaltmalar

-2lnL	-2log likelihood (-2log olabilirlik)
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABS	Absorbans
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan Tür Kültür Koleksiyonu)
AU	Arbitrary Unit
BHI	Brain Heart Infusion
CAMP	Christie Atkins Munch Peterson

CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi)
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute (Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
EC	European Commission (Avrupa Komisyonu)
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GRAS	Generally Regarded as Safe (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen)
HL	Hosmer-Lemeshow
ISO	International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Örgütü)
IU	International Unit (Uluslararası Birim)
JECFA	Joint Expert Committee in Food Additives and Contaminants (Gıda Katkı Maddeleri ve Bulaşanlar Konusunda Ortak Uzman Komitesi)
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MIC/MİK	Minimum Inhibition Concentration (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu)
MS	Mean Square (Ortalama Kare Değeri)
MSE	Mean Squared Error (Hata Kareler Ortalaması)
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
P	Probability (Olasılık)
PALCAM	Polymyxin-Acriflavine-Lityum-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol
QPS	Qualified Presumption of Safety (Nitelikli Güvenlik Varsayımı)
R^2	Determination Coefficient (Belirleme Katsayısı)
RMSE	Root Mean Square Error (Hata Kareler Ortalamasının Karekökü)
RTE	Ready-to-Eat (Tüketime Hazır)
SE	Standard Error (Standart Hata)
Sig.	Significance (Anlamlılık)
spp.	Species (Türler)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler için İstatistik Programı)
SS_{Fark}	Sum of Square (Farkların Kareleri Toplamı)
sspp.	Subspecies (Alt türler)
subsp./ssp.	Subspecies (Alt tür)
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TM	Trade Mark (Ticari Marka)
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TTD	Time to Detection (Tespit Süresi)
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UHT	Ultra-High Temperature (Ultra Yüksek Isı)
UK	United Kingdom (Birleşik Krallık)
USDA	United States Department of Agriculture (ABD Tarım Bakanlığı)
ÜFD	Üç Fazlı Doğrusal
w/v	Weight/Volume (Hacimde Ağırlıkça Yüzde)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
YÖK	Yüksek Öğretim Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 120-3P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler) ... 46

Şekil 4.2 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler) ... 46

Şekil 4.3 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 151-1P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler) ... 47

Şekil 4.4 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 241-1P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler) ... 47

Şekil 4.5 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler) ... 48

Şekil 4.6 Sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 120-3P suşunun koloni sayısı veya gelişme verileri (gri daireler) ile modifiye Gompertz denklemi (a), Baranyi modeli (b) ve Üç Fazlı Doğrusal modelin (c) uyumu (siyah çizgiler) ... 49

Şekil 4.7 Sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 137-3P suşunun koloni sayısı veya gelişme verileri (gri daireler) ile modifiye Gompertz denklemi (a), Baranyi modeli (b) ve Üç Fazlı Doğrusal modelin (c) uyumu (siyah çizgiler) ... 49

Şekil 4.8 Sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun koloni sayısı veya gelişme verileri (gri daireler) ile modifiye Gompertz denklemi (a), Baranyi modeli (b) ve Üç Fazlı Doğrusal modelin (c) uyumu (siyah çizgiler) ... 50

Şekil 4.9 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^3 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri ... 56

Şekil 4.10 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^4 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri . 57

Şekil 4.11 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^5 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri . 58

Şekil 4.12 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^6 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri .59

Şekil 4.13 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^3 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri .60

Şekil 4.14 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^6 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri .61

Şekil 4.15 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) farklı sıcaklık ve nisin konsantrasyonlarında (%1,5 NaCl konsantrasyonunda ve $10^{4,4}$ KOB/mL suş yoğunluğunda) gelişme olasılıkları 65

Şekil 4.16 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı sıcaklıkta nisin konsantrasyonuna göre (%1,5 KCl konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları 68

Şekil 4.17 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı nisin konsantrasyonunda sıcaklığa göre (%1,5 KCl konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları 69

Şekil 4.18 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı sıcaklıkta nisin konsantrasyonuna göre (%0,125 potasyum sorbat konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları 72

Şekil 4.19 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı nisin konsantrasyonunda sıcaklığa göre (%0,125 potasyum sorbat konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları 73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *Listeria* cinsinde bulunan tür ve alt türler 5

Çizelge 2.2 Gıda kaynaklı listeriozis salgınları 11

Çizelge 3.1 Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar 32

Çizelge 4.1 *Listeria monocytogenes* suşlarının MİK Değerleri 43

Çizelge 4.2 *L. monocytogenes* suşlarının OD değerleri ile Denklem (1)'e göre hesaplanan gelişme hızları 48

Çizelge 4.3 *L. monocytogenes* suşlarının koloni sayısı verilerinden Baranyi, Gompertz ve Üç Fazlı Doğrusal modeller kullanılarak hesaplanan sıvı besiyerindeki gelişme hızları 51

Çizelge 4.4 *L. monocytogenes* 120-3P suşu için bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, NaCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler 53

Çizelge 4.5 *L. monocytogenes* 137-3P suşu için bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, NaCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler 54

Çizelge 4.6 *L. monocytogenes* ATCC için bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, NaCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler 55

Çizelge 4.7 Bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, KCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler 67

Çizelge 4.8 Bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, sorbat ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler 71

1. GİRİŞ

Doğada geniş bir dağılım göstermesi ve yüksek ölüm oranına sahip olması nedeniyle *Listeria monocytogenes*, gıda endüstrisi için önemli bir endişe kaynağı yaratan bir patojendir. *L. monocytogenes* dışkı, toprak, su, bitki örtüsü, kanalizasyon, hayvan yemleri, çiftlik ortamları ve gıda işleme ortamları dahil olmak üzere birçok farklı çevresel kaynaktan izole edilebilmektedir. Buzdolabı sıcaklığı, asidik pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi zorlu stres koşullarına tolerans gösterebilmesi nedeniyle gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından da önem taşımaktadır.

L. monocytogenes, listeriozis salgınlarının ana etmenidir. Ateşli gastroenterit olarak gelişebilen veya menenjit ve sepsis ile daha şiddetli bir seyir gösterebilen listeriozis; gıda kaynaklı en önemli hastalıklardan birisi olup, yüksek ölüm oranları ile karakterizedir. Özellikle risk grubundaki hassas bireylerde yüksek ölüm oranlarına sebebiyet vermesi nedeniyle *L. monocytogenes* için, ülkemizde sıfır tolerans politikası yürütülmektedir.

L. monocytogenes'in gıdalarda kontrolü amacıyla genellikle düşük sıcaklık, asitlik, su aktivitesi, doğal veya kimyasal koruyucular gibi faktörlerin birleştirilerek engeller teknolojisinin uygulanması gibi yöntemler kullanılmaktadır. Doğal veya az işlem görmüş ve katkı maddesi içermeyen gıdalar, günümüzde tüketiciler tarafından giderek daha fazla tercih edilmektedir. Gıdalara uygulanan geleneksel ısıl işlemler, gıdanın raf ömrünün uzamasını ve mikrobiyal açıdan güvenirliliğinin artmasını sağlarken, diğer yandan gıdalarda besin, vitamin ve renk kaybına ve/veya değişimine neden olabilmektedir. Ayrıca gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde ve gıda muhafazasında kullanılan katkı maddelerinin bir kısmının insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunabilmektedir. Biyokoruma alternatif gıda muhafaza teknikleri arasında yer alıp, ürünün raf ömrünü ve hijyenik kalitesini arttırmaktadır. Günümüzde gıdalarda bakteriyosin ve bakteriyofajlar uygulamaları, doğal gıda biyokoruyucuları olarak bilinmektedir.

Nisin, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan doğal bir biyokontrol ajanıdır. Gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılması Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization) tarafından onaylanan tek bakteriyosindir. Ürünün raf ömrünü uzatmak, gıda kaynaklı patojenlerin bulaşma riskini azaltmak, tuzların, asitlerin ve diğer kimyasal koruyucuların kullanımını azaltmak gibi çeşitli avantajlar sağlaması bakımından, gıda endüstrisinde nisin kullanımı giderek benimsenmiştir. Nisin gıdalarda bakteriyostatik bir ajan olarak tek başına veya diğer koruyucularla kombinasyon halinde kullanılabilmektedir. Yaygın olarak kullanılan koruyuculardan biri de tuz olup, gıda muhafazasında nisinin tuzlarla kombine kullanımı öne çıkmaktadır. Ancak fazla sodyum tüketmek, çeşitli hastalıklara yol açabilen yüksek tansiyon riskini de artırdığından, gıdalarda NaCl (Sodyum klorür) içeriğinin düşürülmesi de öncelikli hedeflerdendir. Bu nedenle son yıllarda, NaCl yerine kısmen KCl (Potasyum klorür) veya diğer tuzların kullanımına yönelik bir eğilim vardır.

Mikroorganizmaların gıdalarda uygulanan koruyucu maddelerin tek kullanımına veya kombine bir şekilde kullanımına karşı gelişme tepkisini nicel olarak açıklamak için matematiksel modelleme günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Modelleme, engelleyici faktörlerin etkileri ve bunların etkileşimleri hakkında öncelikli olarak bilgi sağlar. Olasılık veya gelişme/gelişmeme arayüz modelleri gıdaların güvenliğinin yönetilmesinde özellikle ilgi çekicidir. Gelişmeye izin veren veya engelleyen çevresel faktörlerin kombinasyonlarını tanımlama yöntemi olarak gelişme/gelişmeme modelleri kullanılabilir. Özellikle, gıdalarda patojenlerin gelişmesini engellemek için kullanılacak koruyucuların ideal konsantrasyon kombinasyonlarını belirlemek için olasılıksal modellerin kullanılması uygun görülmekte ve farklı çevresel koşullar altında bakterilerin gelişme/gelişmeme sınırlarını modellemek için lojistik regresyon yöntemi öne çıkmaktadır.

L. monocytogenes ile ilgili birçok modelleme çalışması olmasına rağmen, *L. monocytogenes* suşlarının hangi koşullar altında potansiyel olarak gelişebileceğini daha iyi anlayabilmek için daha fazla çalışma gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, farklı inokülüm boyutları ile farklı sıcaklık, tuz ve nisin seviyelerinde seçilen suşların gelişme sınırlarını belirlemektir. Bu kapsamda bu tez çalışmasında *L. monocytogenes*

suşlarına karşı nisin, NaCl, KCl ve potasyum sorbatın farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu stres etkileri farklı sıcaklık koşullarında inkübasyon ile araştırılmıştır. Elde edilen gelişme/gelişmeme verileri lojistik regresyon kullanılarak modellenmiştir. Kabul edilebilir model performansıyla bu çalışmada geliştirilen modellerin *L. monocytogenes* gelişmesinin kontrolünde ve gelişme olasılıklarının belirlenmesinde faydalı olabileceği belirlenmiştir. Sonrasında oluşturulan modellerin gıda ortamında validasyonunu göstermek amacıyla UHT süt ve et suyunda suşların gelişme/gelişmeme durumları incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Listeria* spp. ve Genel Özellikleri

Listeria spp. Gram pozitif, yuvarlak uçlu, kısa, çubuk şeklinde (0,5 µm çapında ve 2 µm uzunluğunda), spor oluşturmayan, fakültatif anaerobik, katalaz pozitif ve oksidaz negatif organizmalardır. Doğada her yerde bulunan bu bakteriler psikotropik ve mezofilik ortamlarda gelişebilirler, düşük ve yüksek sıcaklıklara tolerans gösterebilirler. Bu bakteriler, genellikle "V" şeklinde tek veya kısa zincirler oluşturarak kavisli olabilir (Yehia vd. 2016, Jamshidi ve Zeinali 2019). *Listeria* psikrotrofiktir, çok geniş bir sıcaklık aralığında (-0,1 ile 45 °C) gelişim gösterebilir. Ayrıca 4,4 ile 9,6 pH aralığında ve %10'a kadar NaCl içeren ortamlarda rahatlıkla gelişebilmektedir. Bu cins içinde yer alan türlerin hiçbiri kapsül yapısına sahip değildir (Milillo vd. 2012). *Listeria* cinsi, katalaz aktivitesi göstermesi, hidrojen sülfür üretiminin olmaması ve glikozdan asit üretimi ile karakterize edilir. Pozitif metil kırmızısı reaksiyonu ile pozitif Voges-Proskauer reaksiyonu bulunmaktadır. İndol üretmez, sitratı kullanamaz veya üreaz aktivitesine sahip değildir (Batt 2014a).

Listeria cinsi, son on yılda, çeşitli fenotipik ve genotipik özelliklere sahip 17 türü içerecek şekilde önemli ölçüde genişlemiştir (Orsi ve Wiedmann 2016). Günümüzde *Listeria* cinsi içinde 28 tür ile 6 alt tür tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) (Anonymous 2020).

Listeria cinsi; bu cinsi temsil eden türlerin, *L. monocytogenes* ile olan ilişkisine dayanarak sensu stricto ve sensu lato olmak üzere iki ayrı klada sınıflandırılmıştır. *Listeria* sensu stricto; *L. monocytogenes, L. innocua, L. ivanovii, L. seeligeri, L. marthii, L. welshimeri, L. farberi, L. immobilis* ve *L. cossartiae* türlerini içerirken; *Listeria* sensu lato; *L. grayi, L. fleischmannii, L. floridensis, L. aquatica, L. costaricensis, L. goaensis, L. thailandensis, L. valentina, L. newyorkensis, L. cornellensis, L. rocourtiae, L. weihenstephanensis, L. grandensis, L. riparia, L. booriae, L. portnoyi* ve *L. rustica* türlerini içermektedir (Orsi ve Wiedmann 2016, Amajoud vd. 2018, Carlin vd. 2021).

Çizelge 2.1 *Listeria* cinsinde bulunan tür ve alt türler

TÜRLER	**KAYNAK**
Listeria aquatica	Den Bakker vd. 2014
Listeria booriae	Weller vd. 2015
Listeria cornellensis	Den Bakker vd. 2014
Listeria cossartiae	Carlin vd. 2021
Listeria costaricensis	Núñez-Montero vd. 2018
Listeria farberi	Carlin vd. 2021
Listeria fleischmannii	Bertsch vd. 2013
Listeria floridensis	Den Bakker vd. 2014
Listeria goaensis	Doijad vd. 2018
Listeria grandensis	Den Bakker vd. 2014
Listeria grayi	Errebo Larsen ve Seeliger 1966 (Approved Lists 1980)
Listeria ilorinensis	Raufu vd. 2022
Listeria immobilis	Carlin vd. 2021
Listeria innocua	Seeliger 1983
Listeria ivanovii	Seeliger vd. 1984
Listeria marthii	Graves vd. 2010
Listeria monocytogenes	Murray vd. 1926/ Pirie 1940 (Approved Lists 1980)
Listeria murrayi	Welshimer ve Meredith 1971 (Approved Lists 1980)
Listeria newyorkensis	Weller vd. 2015
Listeria portnoyi	Carlin vd. 2021
Listeria riparia	Den Bakker vd. 2014
Listeria rocourtiae	Leclercq vd. 2010
Listeria rustica	Carlin vd. 2021
Listeria seeligeri	Rocourt ve Grimont 1983
Listeria thailandensis	Leclercq vd. 2019
Listeria valentina	Quereda vd. 2020
Listeria weihenstephanensis	Lang Halter vd. 2013
Listeria welshimeri	Rocourt ve Grimont 1983

Çizelge 2.2 *Listeria* cinsinde bulunan tür ve alt türler (devam)

ALT TÜRLER	**KAYNAK**
Listeria cossartiae subsp. *cayugensis*	Carlin vd. 2021
Listeria cossartiae subsp. *cossartiae*	Carlin vd. 2021
Listeria fleischmannii subsp. *coloradonensis*	Den Bakker vd. 2013
Listeria fleischmannii subsp. *fleischmannii*	(Bertsch vd. 2013) den Bakker vd. 2013
Listeria ivanovii subsp. *ivanovii*	(Seeliger vd. 1984) Boerlin vd. 1992
Listeria ivanovii subsp. *londoniensis*	Boerlin vd. 1992

Listeria sensu strictu türlerinin, grup içinde ortak birçok fenotipik özelliği bulunmaktadır. Bu özellikleri sayesinde diğer *Listeria* spp. üyelerinden kolaylıkla ayırılabilmektedir. Bunlar;

1) 4°C'de gelişebilme özelliği
2) Hareketlilik (en az 30 °C'de),
3) Pozitif katalaz reaksiyonu,
4) Nitratı nitrite indirgememe,
5) Bütandiol yolu boyunca glikozun fermantasyonundan asetoin üretme kabiliyetini gösteren Voges-Proskauer testinde pozitif reaksiyon,

Ayrıca, tüm *Listeria* sensu strictu türleri D-arabitol, α-metil D-glukozit, sellobiyoz, D-fruktoz, D-mannoz, N-asetilglukozamin, maltoz ve laktozu fermente edebilirken, türlerin hiçbiri inositol, L-arabinoz ve D-mannitol'ü fermente edemez. *Listeria* sensu strictu genomları birçok ortak özelliği paylaşır. G+C içeriği %34,6 ile %41,6 arasında değişir. Genom boyutları 2,8 ile 3,2 Mb arasındadır (Orsi ve Wiedmann 2016).

Listeria sensu lato türleri de katalaz pozitif, spor oluşturmayan, kapsülsüz ve çubuk şeklindedir. *Listeria* sensu lato türleri, onları *Listeria* sensu strictu türlerinden ayıran çeşitli fenotipik özelliği paylaşır. *Listeria* sensu lato genomlarının G+C içeriği %38,3 (*L. fleischmannii*) ile %45,2 (*L. newyorkensis* ve *L. booriae*) arasında değişir. Patojenite açısından, *Listeria* sensu lato türlerinin hiçbiri hem hemolitik testlerde hem de

fosfoinositid fosfolipaz C aktivite testlerinde pozitif sonuç vermediği için, patojenik özellik göstermediği saptanmıştır (Orsi ve Wiedmann 2016).

Listeria spp. türleri arasında insan ve hayvan patojeni olarak *L. monocytogenes* öne çıkmaktadır (Yehia vd. 2016). *Listeria* spp. öncelikli olarak tüketime hazır gıdalar (RTE: Ready-to-Eat) başta olmak üzere, birçok farklı gıda türünde kontaminasyon riski yaratan bir patojendir (Silva-Angulo vd. 2014, Jamshidi ve Zeinali 2019).

2.2 *Listeria monocytogenes* ve Genel Özellikleri

*L. monocytogenes Listeria*ceae familyası *Listeria* cinsine içinde yer alan, Gram pozitif (Ranadheera vd. 2017), düşük G+C içeriğine ve yüksek ölüm oranına sahip, spor oluşturmayan, aerobik/fakültatif anaerobik psikrotrofik bir türdür. İnsanlarda ve hayvanlarda ciddi hastalıklara neden olabilmektedir (Jamali vd. 2013a). *L. monocytogenes* insan hücresine girerken kaybolabilen bir ile beş peritrik kamçı sayesinde hareketlidir (Yehia vd. 2016). CAMP (Christie Atkins Munch Peterson) testinin bir parçası olan kanlı agar plakalarında β-hemolizin üretir (Batt 2014b). *L. monocytogenes*, çeşitli stres koşulları altında gelişebilir ve hayatta kalabilir. Yüksek düzeyde ozmotolerans gösterir. %10 ve üzerindeki NaCI (w/v) içeren ortamlarda gelişebilir ve/veya canlılığını koruyabilir (Mansell 2022).

L. monocytogenes'e gıda kaynaklı bir patojen olarak ilgi 1980'lerde başlamış olsa da bu patojen yaklaşık 100 yıl önce keşfedilmiştir. Bu patojene ilk olarak *Bacterium monocytogenes* adı verilmiştir. 1927'de *Listerella hepatolytica* olarak isimlendirildikten sonra, 1940'ta J. H. H. Pirie tarafından, cerrah Joseph Lister'i onurlandırmak için adı *Listeria monocytogenes* olarak değiştirilmiştir (Batt 2014b).

L. monocytogenes'in optimum gelişme sıcaklığı 30–37 °C'dir, ancak 0 ile 45 °C arasında yaşayabilir. *L. monocytogenes* buzdolabı sıcaklıklarında çoğalabilir, dezenfektanlara karşı dayanıklıdır ve çeşitli yüzeylere yapışabilir. Gıda endüstrisinde, *L. monocytogenes*,

potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olarak hareket edebilen biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca sağlıklı insan ve hayvanlardan veya enfekte evcil ve vahşi hayvanlardan da izole edildiği rapor edilmiştir (Jamshidi ve Zeinali 2019).

Somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerine sahip olan *L. monocytogenes*'te 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7 dahil olmak üzere 13 serotip tanımlanmıştır. Gıda veya gıda üretim ortamları genellikle 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotipleri risk yaratmaktadır (Hussain ve Ahmad 2016, Jamshidi ve Zeinali 2019). *L. monocytogenes*, dört evrimsel soydan (I, II, III ve IV) oluşur. İnsan klinik vakalarıyla yaygın olarak ilişkilendirilen *L. monocytogenes* izolatlarının çoğu, soy II (serotip 1/2a) ve soy I (serotip 1/2b ve 4b) grubuna dahildir. Bununla birlikte, çoğu insan listeriozis salgınları, soy I izolatları ile ilişkilidir. Soy III ve IV suşları ise nadirdir ve ağırlıklı olarak hayvansal kaynaklardan izole edilir (Shen vd. 2013).

L. monocytogenes özellikle tüketime hazır soğutulmuş gıdalarda, gıda güvenliği endişelerine yol açar (Shi vd. 2015, Amajoud vd. 2018). *L. monocytogenes*'in paslanmaz çelik üzerinde biyofilm oluşturma ve gıda işleme ortamında hayatta kalma yeteneği, gıda kontaminasyonu olasılığını artırır ve bu nedenle yalnızca patojenitesi nedeniyle değil, aynı zamanda doğal ve gıda işleme ortamlarında kalıcılığı nedeniyle de tüketiciler için bir tehdit olmaya devam etmektedir (Milillo vd. 2012, Ramires vd. 2021, Mansell 2022).

Gıdalarda *L. monocytogenes*'in izolasyonu ve saptanması, genellikle Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO: International Organization for Standardization) (ISO 11290), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: Food and Drug Administration) ve ABD Tarım Bakanlığı (USDA: United States Department of Agriculture) tarafından onaylanan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir (Jamali vd. 2013a). *L. monocytogenes*'i tanımlamaya yönelik geleneksel yöntemler zaman alıcıdır. Halihazırda tavsiye edilen *Listeria* seçici besiyerleri, PALCAM (Polymyxin-Acriflavine-Lityum-Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol) agar ve seçici takviyeler eklenen Oxford *Listeria* bazıdır (Liu vd. 2015).

2.3 Listeriozis

Listeriozis, gıda kaynaklı en önemli hastalıklardan biridir ve yüksek ölüm oranları ile karakterizedir. *L. monocytogenes*, insan listeriozis salgınlarının ana nedenidir. Listeriozis, ateşli gastroenterit olarak gelişebilir veya menenjit ve sepsis ile daha şiddetli bir seyir gösterebilir. Parenteral semptomlar, öncelikle hamile kadınlar, yeni doğanlar, yaşlılar ve bağışıklığı azalmış kişiler (nakil alıcıları, anti-kanser ilaçları alan veya immünosupresif tedavi gören hastalar veya Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu) dahil olmak üzere risk altındaki kişilerde görülür. Bu grupta listeriozisin ölüm oranı %20-30'dur (Zakrzewski vd. 2020).

Listeriozis klinik olarak organizmanın kan dolaşımında, beyin omurilik sıvısında veya normalde steril olan bir vücut bölgesinde bulunması olarak tanımlanabilir. İnsan listeriozisinin baskın klinik belirtileri ishal, menenjit, ensefalit ve septisemidir. Bu belirtilerin yanı sıra endokardit, perikardit ve piyojenik apseler de bildirilmiştir (Hussain ve Ahmad 2016). İnsanlarda gıda kaynaklı listeriozisin ana nedeni *L. monocytogenes* olmakla beraber nadiren *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* suşlarının da gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Jamshidi ve Zeinali 2019). Listeriozis vakalarından yüzde doksan beşi *L. monocytogenes* suşlarının 1/2a, 1/2b ve 4b serotipleri sorumludur. 1/2a serotipi gıda örneklerinden en çok izole edilen serotip olmasına rağmen, insanlardaki listeriozisin çoğunluğu serotip 4b ile bağlantılıdır. 3a, 3b, 4d ve 4e serotiplerinin de gıda ortamlarından izole edildiği rapor edilmiştir (Jamali vd. 2013b).

Listeriozis salgınları ve sporadik listeriozis vakaları; süt, yumuşak peynir, sosis, tütsülenmiş balık, yıkanmamış çiğ sebze ve meyveler, salatalar, et ve et ürünleri, deniz ürünleri ve RTE dahil olmak üzere çeşitli gıda maddelerinin kontaminasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Milillo vd. 2012, Soni vd. 2014a, Borena vd. 2022). *L. monocytogenes*'in neden olduğu gıda kaynaklı enfeksiyonların yıllık ortalama insidansı, *Salmonella*, *Campylobacter*, patojenik *Escherichia coli* gibi diğer patojenlerle karşılaştırıldığında düşüktür. Ancak, *L. monocytogenes* %30'a varan vaka-ölüm oranı ile yüksek mortalitesi nedeniyle önem taşımaktadır (Gómez vd. 2014).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC: Centers for Disease Control and Prevention)'nin 2020 raporuna göre ABD'de her yıl 1600 kişinin listeriozis nedeniyle hastalandığı ve yaklaşık 260 kişinin öldüğü tahmin edilmektedir. Benzer şekilde, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA: European Food Safety Authority)'nin 2019 raporuna göre listeriozis, yüksek vaka ölüm oranı (%15,6) ile Avrupa Birliği'ndeki (AB) en ciddi gıda kaynaklı hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir (Ramires vd. 2021).

Listeriozis, 100.000 nüfus başına yıllık 0,41 vaka insidansı ile Avrupa'da yaygın olarak görülen dördüncü zoonotik hastalıktır. Asya ülkelerinde, tespit veya bildirimin başarısız olması nedeniyle nadiren listeriozis raporları mevcuttur. Ancak, *L. monocytogenes*, Hindistan'da spontane düşüklerin ve ölü doğumların etiyolojik faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Jamshidi ve Zeinali 2019).

2.4 Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Riski

Çevrede her yerde bulunması ve zorlu çevre koşullarına karşı toleransı nedeniyle *Listeria,* gıda üretimi ve dağıtımı sırasında birçok noktada gıdayı kontamine edebilir. Ayrıca, buzdolabı sıcaklıklarında gelişebilme yeteneği ile soğukta muhafaza edilen minimal işlenmiş gıdalar açısından da risk oluşturmaktadır (Liu vd. 2015). *L. monocytogenes*'in patojenik potansiyelinin belirlenmesi, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır (Jamshidi ve Zeinali 2019).

Gıdalarda herhangi bir *Listeria* spp.'nin varlığı, hijyen eksikliğinin bir göstergesidir (Yehia vd. 2016). CDC tüm gıda kaynaklı patojenler arasında *L. monocytogenes*'in en yüksek hastaneye yatış oranını (%90,5) ve ikinci en yüksek vaka ölüm oranını (%21) sergilediğini bildirmiştir (Milillo vd. 2012). Bu nedenle gıda ürünlerinde ve çevrede *L. monocytogenes*'i tespit edip diğer *Listeria* türlerinden ayırt edebilen hızlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmek kritik öneme sahiptir (Liu vd. 2015).

Listeria spp. türlerinden *L. monocytogenes* insanlarda ve diğer memeli türlerinde hastalığa neden olurken, *L. ivanovii* öncelikle geviş getiren hayvanlarda hastalığa neden olur (Milillo vd. 2012). *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*, gıda zehirlenmesine bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (Tao vd. 2017). CDC verilerine göre 2011 ile 2022 yılları arasında yaşanmış önemli gıda kaynaklı listeriozis salgınları Çizelge 2.2'de özetlenmiştir (Anonymous 2023).

Çizelge 2.3 Gıda kaynaklı listeriozis salgınları

Yıl	**Gıda Kaynağı**	**Vaka**	**Hastaneye Yatış**	**Ölüm**
2022	Bilinmeyen Kaynak	11	10	0
	Enoki Mantarları	3	3	0
	Şarküteri Et ve Peynir	16	13	1
	Brie ve Camembert Peyniri	6	5	0
	Dondurma	28	27	1
2021	Paketli Salatalar	10	10	1
	Taze Ekspres Paketlenmiş Salatalar	18	16	3
	Tam Pişmiş Tavuk	3	3	1
	Meksika Yumuşak Peyniri	13	12	1
2020	Şarküteri Etleri	12	12	1
	Enoki Mantarları	36	31	4
2019	Haşlanmış Yumurta	8	5	1
	Şarküteri Dilimlenmiş Etler ve Peynirler	10	10	1
2018	Domuz Ürünleri	4	4	0
	Şarküteri Jambonu	4	4	1
2017	Yumuşak Çiğ Süt Peyniri	8	8	2
2016	Dondurulmuş Sebzeler	9	9	3
	Çiğ Süt	2	2	1
	Paketli Salatalar	19	19	1
2015	Yumuşak Peynirler	30	28	3
	Dondurma	10	10	3
2014	Paketli Karamelli Elmalar	35	34	7
	Fasulye Filizi	5	5	2
	Peynir	5	4	1
	Süt Ürünleri	8	7	1
2013	Peynir	6	6	1
2012	Ricotta Salata Peyniri	22	20	4
2011	Kavun	147	143	33

FDA yönetmeliği, listeriozis ile ilişkili yüksek ölüm oranı ve belirlenememiş enfeksiyöz dozu nedeniyle gıdalarda *L. monocytogenes* için sıfır tolerans koşulu uygulamaktadır. *L. monocytogenes* haşlanmış yumurta, şarküteri ürünleri, çiğ süt ve dondurmayla bağlantılı birçok salgına aracılık etmiştir. Taze ürünler genellikle çiğ olarak tüketildiğinden, *L. monocytogenes* kontaminasyonu için potansiyel bir araç olarak görülmektedir (Townsend vd. 2021). İnek sütü, özellikle bebekler ve çocuklar için besleyici ve değerli bir gıda maddesidir. Aynı zamanda patojenik mikroorganizmalar için de uygun bir gelişme ortamı oluşturduğu için, *L. monocytogenes* kontaminasyonunda ana gıda vektörlerinden biri olarak tanımlanmaktadır (Jia vd. 2021).

Gıda güvenliği kriterleri, bir gıda maddesinin mikrobiyolojik güvenliği açısından kabul edilebilirliğini tanımlamaktadır. Raf ömürleri boyunca piyasaya arz edilen gıda maddelerine yönetmeliklerle belirlenen bu kriterler uygulanır (Anonymous 2011). ABD, 25 g gıda maddesinde sıfır tolerans yaklaşımına sahiptir (Wemmenhove vd. 2021). AB mevzuatı (EC 2073/2005) ise *L. monocytogenes*'in raf ömrü boyunca 100 KOB/g sınırını aşmamasını şart koşmuştur (Tiwari vd. 2014, Possas vd. 2021, Skjerdal vd. 2021). Gıda ürünlerinde düşük seviyelerdeki *L. monocytogenes* varlığının insan sağlığı için önemli seviyede bir risk oluşturmadığı düşüncesiyle Kanada ve Almanya'nın da içinde yer aldığı bazı ülkeler, *L. monocytogenes*'i düşük seviyede içeren ve yüksek seviyelerde gelişmesine imkân vermeyen RTE için bir tolerans limiti belirlemişlerdir (Öncü 2012). Buna göre RTE gıdalarda *L. monocytogenes* kriterleri şu şekilde belirlenmiştir (Anonymous 2019);

- Bir işletmenin, RTE ürününün *L. monocytogenes*'in gelişmesini desteklemeyeceğini gösterebildiği durumlarda, "100 KOB/g'yi aşmayan" ifadesi geçerlidir.
- Bir işletmenin, RTE ürününün *L. monocytogenes*'in gelişimini desteklemeyeceğini kanıtlayamadığı durumlarda, "25 g'da tespit edilmedi" ifadesi geçerlidir.
- Bir RTE yiyeceğinin *L. monocytogenes*'in gelişmesini destekleyeceği durumlarda, "25 g'da tespit edilmedi" ifadesi geçerlidir.

Ülkemizde 2011 yılında yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde ise RTE'nin satış noktasına ulaştığı aşama için herhangi bir kabul edilebilir limit belirlenmemiş olup, *L. monocytogenes* için sıfır tolerans politikasıyla sadece "0/25 g-mL" şeklinde genel olarak 25 g ya da mL gıdada bulunmamalı olarak belirtilmiştir (Öncü 2012).

2.5 Gıdalarda *Listeria monocytogenes*'in Biyokontrolü

Biyolojik kontrol veya biyokontrol/biyokoruma, başka bir istenmeyen organizmanın gelişmesini kontrol etmek veya önlemek için antagonistik organizmaların ve/veya metabolitlerinin kullanılmasıdır (Falardeau vd. 2021). Bir gıda alanında uygulanan geleneksel antimikrobiyal stratejiler genellikle doğal ve minimum düzeyde işlenmiş gıdalara yönelik artan tüketici taleplerini karşılayamayan zorlu koşullar ve karmaşık protokoller gerektirir. Biyo bazlı antibakteriyel ajanların uygulanması, gıda matrisleri üzerindeki patojen kontaminasyonlarını kontrol etmek için alternatif bir strateji olarak kabul edilir (Wu vd. 2022). Tüketiciler gıda güvenliğinin önemi konusunda daha bilinçli hale geldikçe, yeni biyokontrol yöntemlerinin kullanımı daha fazla ilgi görmektedir (Gray vd. 2018). Biyokontrol ajanı olarak bakteriyosinlerin ve litik bakteriyofajların (fajlar) kullanımı, gıda patojenlerine karşı gıda muhafaza stratejilerinden biri olarak etkili bir alternatif olarak görülmektedir (Baños vd. 2016).

Fajlar, bakteri içinde enfekte olan ve çoğalan virüslerdir. İlk olarak 1915'te keşfedilmiştir. Fajlar, bakteri hücre duvarı reseptörleri tarafından belirlenen konakçılarına karşı yüksek özgüllüğe sahiptir. Fajlar çevrede yaygın olarak bulunur. Suda, toprakta ve et, kümes hayvanları, süt ürünleri ve taze ürünler gibi çeşitli gıdalarda bulunurlar. Fajlar, hayvanlar ve insanların tedavisinde bakterilere karşı kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve kullanılmıştır. Ayrıca tarımda da uygulanma potansiyeli bulunmaktadır (Pietrysiak vd. 2019). Konakçı bakterinin yokluğunda, fajlar metabolik olarak inert bir durumda bulunur. Ayrıca konakçısına karşı gösterdiği yüksek özgüllüğü nedeniyle, fajlar gıda güvenliği uygulamaları için mükemmel araçlar haline getirir. 2007 yılında, FDA tüm çiğ ve RTE için LISTEX P100 fajının kullanımını onaylamıştır. LISTEX™ P100, FDA (GRAS 198)

ve USDA (GRAS 218) tarafından GRAS (Generally Regarded as Safe: Genel Olarak İnsan ve Hayvan Tüketimi için Güvenilir) olarak kabul edilmiştir. *L. monocytogenes* kontaminasyonuna duyarlı tüm gıda ürünlerinde işleme yardımcısı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Baños vd. 2016, Gray vd. 2018).

Laktik asit bakterilerinin (LAB), GRAS olarak kabul edilmesi ve ayrıca çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretme kapasiteleri nedeniyle, koruyucu kültür olarak gıdalarda kullanılmaktadır. Ayrıca, birçok LAB türü nitelikli güvenlik varsayımı (QPS: Qualified Presumption of Safety) listesine dahil edilmiştir (Bolívar vd. 2021). Gıda patojenlerine karşı gıda endüstrisinde LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerinin kullanılması ve/veya fiziksel ve kimyasal işlemlerle kombine halde yaygın bir şekilde uygulanması söz konusudur (Baños vd. 2016).

2.5.1 Bakteriyosinler

Bakteriyosinler hem Gram pozitif hem de Gram negatif patojenik bakterileri inhibe edebilen, 20-60 amino asit uzunluğunda, katyonik ve hidrofobik, ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyal peptitlerdir (Kumariya vd. 2019, Negash ve Tsehai 2020). Bakteriyosinler, GRAS veya QPS mikroorganizmalar tarafından üretilir (O'Connor vd. 2020).

İlk bakteriyosin üretimine ilişkin raporlar 1925 yılında *E. coli*'den alınmıştır ve bu peptit, mikrobiyal kaynağı yansıtması için "kolikinler" olarak adlandırılmıştır. Ancak LAB tarafından üretilen bakteriyosinler özel bir öneme sahiptir, çünkü bu bakteriler FDA tarafından GRAS statüsü almıştır. Böylece *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin yaygın ticari uygulama kazanan ilk bakteriyosin olmuştur. O zamandan beri, farklı bakteri türlerinden tarafından üretilen çok sayıda bakteriyosin tanımlanmıştır (Negash ve Tsehai 2020). Antibiyotiklerin etki mekanizmasına benzerlik gösteren bir mekanizmaya sahip olması bakımından, gıdalarda antibiyotik kullanımını sınırlandırması bakımından avantaj kazanmaktadır. Birçok bakteri türü tarafından sentezlenen tür içi ve/veya türler arası mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olan bakteriyosinler, çeşitli

antimikrobiyal ajanlarla sinerjistik etki gösterebilir (Güneş-Altuntaş 2014). 1925'te Gratia, daha sonra kolisin V olduğu belirlenen antimikrobiyal peptitin inhibe edici aktivitesini göstermiştir. Bundan kısa bir süre sonra, 1928'de, Rogers tarafından nisin aktivitesi rapor edilmiştir. Ancak nisin bileşiğinin tanımlanması, konsantre edildiği 1947 yılına kadar gerçekleşmemiştir. 'Bakteriyosin' terimi, 1953'te ortaya atılmıştır. Aynı yıl nisin, gıda koruyucu olarak İngiliz pazarında kullanıma sunulmuştur. Bakteriyosinlerin yapısal olarak aydınlatılması 1970'lerde gerçekleşmiş ancak 1988 yılına kadar nisinin ABD gıda endüstrisinde GRAS statüsünde bir katkı maddesi olarak kullanılması onaylanmamıştır. Bakteriyosin araştırmalarının gördüğü ilgi 1990'larda büyük ölçüde artmış ve günümüzde de halen devam etmektedir (Snyder ve Worobo 2014). Günümüzde ticari olarak üretilen bakteriyosinler, *L. lactis* tarafından üretilen nisin ve *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pediocin PA-1'dir. Bu bakteriyosinler sırasıyla Nisaplin™ ve ALTA™ 2341 isimleriyle pazarlanmaktadır (Negash ve Tsehai 2020).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, yapısal ve fizikokimyasal özelliklerine göre üç ana sınıfa ayrılır. Sınıf I bakteriyosinler, lantibiyotikler olarak adlandırılan küçük (<5 kDa) ısıya dayanıklı peptitlerdir ve Nisin, laktisin 3147, mersacidin bu gruba örnek gösterilebilir. Sınıf II bakteriyosinler lantionin içermeyen, ısıya dayanıklı küçük peptitlerdir (<10 kDa). Pediosin PA-1, sakasin A, laktasin F ve laktokoksin G, gasserisin A, sirküler A ve karnosiklin A bakteriyosinlerini içerir. Sınıf III bakteriyosinler yüksek moleküler ağırlığa (>30 kDa) sahip ısıya duyarlı proteinlerdir. Bazı kolikinler, megasinler, klebisin, helvetisin I ve enterolysin bu grubun üyeleridir. Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler ise, kolisinler olarak bilinen yüksek moleküler kütleli proteinler (30-80 kDa) ve mikrosinler olarak adlandırılan düşük moleküler kütleli peptitler (1 ile 10 kDa arasında) olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Kumariya vd. 2019, Negash ve Tsehai 2020).

En ayrıntılı şekilde incelenen bakteriyosinler, *E. coli* (kolikinler) ve LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. LAB bakteriyosinlerinin çoğunun hedef noktası bakteri hücre duvarıdır. Spesifik olarak lipid II kısımlarına bağlanırlar ve gözenekler oluşturabilir veya hücre duvarı biyosentezini inhibe edebilirler. Hücre duvarı yapısının bozulması, hücre parçalanmasına ve nihayetinde bakteri ölümüne yol açar. Bakteriyosinler, et ve süt

ürünleri gibi bazı gıda ürünlerinin korunmasında yaygın olarak kullanılan geniş antimikrobiyal özellikler sergilerler (Pietrysiak vd. 2019). Günümüzde E-234 numarası ile katkı maddeleri arasında yer alan nisinin kullanım amacı daha çok kremalar, konserve gıdalar, peynir ve pastörize sıvı yumurta gibi gıdalarda *Bacillus* ve *Clostridium* gibi Gram pozitif bakterilerin spor formlarını inhibe etmeye yöneliktir (Güneş-Altuntaş 2014). Pediocin PA-1, *L. monocytogenes*'e karşı özellikle güçlü aktivite sergileyen ve gıda koruyucu olarak kullanılan geniş spektrumlu bir laktik asit bakteriyosinidir. Doğal koruyucu ve lezzet arttırıcılar olarak kullanım potansiyeli göstermiş olan laktisin 3147 ve laktisin 481 gibi birçok bakteriyosin üzerinde ticarileştirilme noktasında çalışmalar devam etmektedir (Negash ve Tsehai 2020).

2.5.1.1 Nisin

Gıda ile ilişkili LAB suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu, sınıf I ve II'ye dahildir. Bakteriyosinlerin en önemli sınıfı, sıra dışı bir amino asit olan lantionin (Lan) içeren lantibiyotiklerdir. Günümüzde 25'ten fazla lantibiyotik tanımlanmıştır ancak en önemlisi ve üzerinde en çok çalışılanı ise nisindir (Gharsallaoui vd. 2016).

Nisin katyonik bir polipeptittir, hidrofobiktir ve ısıya dayanıklıdır. Nisin moleküler ağırlığı 3510 Da'dır ancak bu peptit dimerler (7000 Da, daha kararlı dimer) ve tetramerler (14000 Da) oluşturma yeteneğine sahiptir. Ana varyantlar A, Z ve Q olarak adlandırılır ve farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. Bununla birlikte, nisin A ve Z, sıklıkla pazarlanan en aktif formlardır. Bu iki varyant (A ve Z), 27. pozisyondaki bir amino asitle (nisin A için histidin ve nisin Z için asparajin) farklılık gösterir. Bu yapısal farklılık antimikrobiyal aktiviteyi etkilemez ancak bazı özelliklerini değiştirir (Gharsallaoui vd. 2016). Şimdiye kadar keşfedilmiş ve tanımlanmış olan doğal nisin varyantlarına *L. lactis*'ten nisin A, *L. lactis* NIZO 22186'dan nisin Z, *L. lactis* F10'dan nisin F, *L. lactis* 61-14'ten nisin Q, *Blautia obeum* A2-162'den nisin O_1-O_4, *Streptococcus uberis*'den nisin U-U_2, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*'den nisin P, *Staphylococcus capitis* APC2923'ten nisin J, *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484'ten nisin H ve treoninden saflaştırılmış bir türev olan nisin M gösterilebilir (Wu vd. 2022).

Nisinin ilk ticari formunun 1953 yılında üretilmesinin ardından gıda koruyucusu olarak geniş çapta kullanımı yıllar içinde giderek artmıştır (Güneş-Altuntaş 2014). Nisin, Gıda Katkı Maddeleri ve Bulaşanlar Konusunda Ortak Uzman Komitesi (JECFA: Joint Expert Committee in Food Additives and Contaminants) tarafından 1969 yılında gıda kullanımı için güvenli olarak belirlenmiş ve 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesine eklenmiştir. Daha sonra 1988 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Bugün yaklaşık 60 ülkede nisin gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (López-Cuellar vd. 2016). JECFA tarafından gıda uygulamaları için güvenli olarak kabul edilen nisinin işlenmiş peynir için bir gıda katkı maddesi olarak 12,5 mg saf nisin/kg ürün konsantrasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir (da Silva Malheiros vd. 2010). ABD'de süt ürünlerinde nisin için yasal sınır 250 mg/kg iken, *L. monocytogenes* için nisin MİK değeri yaklaşık 12,5 mg/L'dir. Sıvı veya katı ortamda 0,125 ila 37,5 mg/L arasında değişen konsantrasyonlardaki nisin, suşa bağlı olarak *L. monocytogenes*'i inhibe edebilir (Ibarra-Sánchez vd. 2020). Peynirde onaylanan saflaştırılmış nisin konsantrasyonları ülkelere göre farklılık göstermektedir. Belçika'da 100 IU/g (2,5 µg/g) kadar düşükken, Birleşik Krallık (UK: United Kingdom)'da üst sınır yoktur. EFSA tarafından, nisinin olgunlaşmamış peynirde 12 µg/g'nin altındaki seviyelerde kullanılmasının bir güvenlik endişesi oluşturmadığı öne sürülmüştür (Falardeau vd. 2021). Gıdalara sulu çözelti olarak eklenmesi tercih edilen nisin toz halinde de kullanılabilmektedir. Alternatif olarak nisin, gıda yüzeylerine spreylenerek dekontamine etmek için de kullanılabilir. Uygulamada, nisin genellikle az miktarda (ağırlıkça %2,5) saf nisin içeren kuru ticari toz formunda bu ürünlerin yüzeyine dahil edilir veya püskürtülür (Gharsallaoui vd. 2016).

Nisin süt ürünleri, konserve gıdalar ve işlenmiş peynir dahil olmak üzere doğal bir gıda koruyucu olarak çok sayıda gıdada kullanım alanı bulmuştur. Bununla birlikte nisinin gıdalarda kullanım potansiyelini artırabilmek için, bu bakteriyosinin gıda bileşenleri ile olan etkileşimlerini ve bu etkileşimlerin nisin aktivitesi üzerindeki etkisini dikkate almak gerekir (da Silva Malheiros vd. 2010). Nisin ticari olarak Nisaplin^{TM} ismi ile doğal gıda koruyucu olarak satılmaktadır. Nisin Z'nin de ticari formu bulunmaktadır. Nisin Z, Nisin A'nın bir varyantı olup yüksek pH'da daha fazla çözünürlüğe sahiptir ve böylelikle gıda uygulamalarında kullanım potansiyelini artırmaktadır. Günümüzde farklı nisin varyantları mevcuttur. Bunlardan biri de *L. monocytogenes* ve *Bacillus cereus* dahil

olmak üzere çeşitli gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip Met21Val varyantı olan nisin V'dir (O'Connor vd. 2020).

Nisin, hidrofobik bir peptit olduğundan gıda matrisindeki yağ küreciklerinin konsantrasyonu ve bütünlüğü, nisin aktivitesini etkileyebilir (Ibarra-Sánchez vd. 2020). Nisinin antimikrobiyal aktivitesi, büyük ölçüde çözünürlüğüne ve pH'ya bağlı olarak değişim gösterebilir. Bu kapsamda pH 3'te maksimum çözünürlüğe ve stabiliteye sahiptir (Ibarra-Sánchez vd. 2020). Aslında, nisin asidik koşullar altında çözünürlüğü daha fazladır ve ayrıca daha kararlı bir yapı gösterir. pH 2,5'te ağırlıkça %12 ve pH 5,0'da ağırlıkça %4 çözünürlüğe sahiptir. pH nötrlüğe ulaştığında ve/veya bunu aştığında ise çözünürlüğü sıfıra yakındır. Benzer şekilde, antimikrobiyal aktivite asidik pH'da daha güçlüdür ve artan pH ile kademeli olarak azalır. Bu da nisinin moleküler yapısının geri döndürülemez bir modifikasyonu ile açıklanabilir. Nisin aktivitesi, düşük sıcaklıklarda (örneğin donma sırasında) oldukça kararlıdır, ancak bu aktivite peptit uzun süre ısıtıldığında kaybolabilir. Nisin, soğutulmuş veya oda sıcaklığında saklanan çok çeşitli sıvı veya katı gıdalarda kullanılabilir (Gharsallaoui vd. 2016).

2.6 *Listeria monocytogenes*'in Nisin ile Biyokontrolü

Nisin, gıda güvenliği açısından güçlü bir antimikrobiyal ajan olarak bilinmektedir. Ancak nisin dirençlilik gelişimi oluşması, patojenlere karşı nisinin tek başına kullanılmasını sınırlayan en önemli faktördür. Bu kapsamda diğer antimikrobiyal etkinlik gösteren ajanlarla kombine bir şekilde kullanılarak nisin etkinliğinin artırılabilmesi günümüzde uygulanan alternatif bir yöntemdir. Örneğin nisin ve *p*-Anisaldehit kombinasyonu, *L. monocytogenes*'e karşı sinerjistik ve uzun süreli bir inhibitör etki sağlamış ve tek başına nisine göre daha etkili bir bakterisidal etki göstermiştir (Chen vd. 2016). Nisin ve organik asitler kullanılarak taze kesilmiş domates üzerinde *L. monocytogenes* biyokontrolünün araştırıldığı bir çalışmada nisin uygulaması önemli ölçüde ($p \leq 0,05$) patojen sayısını 1,91-3,07 $\log_{10}$ KOB/mL azaltmıştır. Nisin-asetik asit kombinasyonu, saklama sıcaklıklarında patojen için en düşük azalma değerlerini (2,93-4,15 $\log_{10}$ KOB/mL) sağlamış ve taze kesilmiş domateste *L. monocytogenes*'in kontrolünde için umut verici bir potansiyel

sinerji gösterdiğini ortaya koymuştur (Oladunjoye vd. 2016). Nisin, laurik arjinat ve P100 fajı kombinasyonunun, soğuk tütsülenmiş somonda *L. monocytogenes*'in başlangıç yükünü azaltması için yapılan bir çalışmada ise, üçlü kombinasyonun *L. monocytogenes* sayısını başlangıçtaki sayıya oranla 2–3 $\log_{10}$ KOB/mL indirgediği gösterilmiştir (Soni vd. 2014b). Nisin A'nın marula uygulanması sonucunda *L. monocytogenes* sayısında en az %90 oranında azalma saptanmıştır. 4 ve 8 °C de, yedi günlük bir depolama süresi boyunca 5 mg/kg nisin ile *L. monocytogenes* gelişmesinde 10 ile 100 kat azalma elde edilirken, marul depolamanın ilk 5 günü boyunca kabul edilebilir duyusal görünümünü korumuştur (McManamon vd. 2019). Nisinin popülasyonlarını tatlı ve sulu kavun dilimlerinde *L. monocytogenes* sayısını kontrol örneğine kıyasla 3,2 $\log_{10}$ ve elma dilimlerinde ise 2,0 $\log_{10}$ azalttığı saptanmıştır. Nisin ile kombine halde faj karışımının kullanıldığı çalışmada ise, *L. monocytogenes* popülasyonlarını kontrol örneğine kıyasla, tatlı ve sulu kavun dilimlerinde 5,7 $\log_{10}$ ve elma dilimlerinde ise 2,3 $\log_{10}$ azaltmıştır (Leverentz vd. 2003).

Nisin ve bitki bileşenlerinin gıda patojenlerine karşı sinerjik aktiviteye sahip olduğu ve nisin ile uçucu yağ kombinasyonlarının güçlü antilisterial aktivite gösterdiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Solomakos vd. 2008, Abdollahzadeh vd. 2014). Kekik esansiyel yağının %0,3, %0,6 ve %0,9 oranları ile nisinin 500 veya 1000 IU/g konsantrasyonunda kombine kullanımlarının *L. monocytogenes*'e karşı hem TSB (Tryptic Soy Broth) ortamında hem de kıyma etinde incelendiği bir çalışmada; %0,6 oranında kekik esansiyel yağı ile 1000 IU/g nisin kombinasyonunun, *L. monocytogenes* sayısında 4 °C'de 2 $\log_{10}$ KOB/g azalma sağladığı tespit edilmiştir (Solomakos vd. 2008).

2.7 Biyokontrol Uygulamalarında Engeller Teknolojisinin Kullanımı

Günümüzde tüketicilerin katkı maddesi içermeyen ve raf ömrü iyileştirilmiş, minimum düzeyde işlenmiş gıda ürünlerine olan ilgisi sayesinde, engeller teknolojisi kavramı ortaya çıkmıştır. Bu uygulama gıdada beslenme ve duyusal kalite kayıplarını azaltan ve gıda güvenliğini açısından umut verici bir teknoloji haline gelmiştir. Engeller teknolojisi genellikle kombine yöntemler, kombinasyon koruma, kombine süreçler, bariyer

teknolojisi veya kombinasyon teknikleri olarak da bilinir. Engel teknolojisi, gıdaların toplam kalitesini artırmayı amaçlar (Khan vd. 2017). Gıda ürünlerinde su aktivitesinde azalma, düşük sıcaklık, pH'ın düşürülmesi, rekabetçi mikroorganizmaların proses ortamına eklenmesi veya koruyucu madde ilavesi gibi çeşitli yollarla gıda güvenliği sağlanabilmektedir. Bu araçların kombine bir şekilde kullanımına "engel etkisi ya da hurdle etkisi" denir (Singh ve Shalini 2016, Pietrysiak vd. 2019, Akritidou vd. 2023). Engel kombinasyonları ve bunların konsantrasyonları ampirik deneylere dayalı olarak belirlenir. Bununla birlikte engeller teknolojisinde gıdanın su içeriği, pH'sı, tuz konsantrasyonu, üretim prosesinde kullanılan çeşni maddeleri ile gıda üretiminde kullanılan paketleme materyali, uygulanan ısıl işlem, üretim sonrası depolama sıcaklığı gibi çoklu engel parametreleri de göz önünde bulundurulmalıdır (Rahman 2015). Engel teknolojisi meyve ve sebzeler, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, balık ve diğer deniz ürünleri, unlu mamüller, makarna, konserve ürünleri, salatalar, meyve suları ve baharatlar gibi farklı gıda gruplarında raf ömrünü uzatmak ve mikrobiyal koruma sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ngnitcho vd. 2017, Aaliya vd. 2021). Çoklu engel teknolojisi gıdalarda patojen gelişimini kontrol edebilmek için kullanılan yaygın bir stratejidir. Engelleri birleştirmenin etkisi, mikroorganizmaların gelişmesini önlemede katkı sağlar veya sinerjistik olabilir (Valero vd. 2006).

Sıcaklık, pH, su aktivitesi, atmosfer gaz basıncı ve koruyucular gibi stres faktörlerinin kombinasyon olarak kullanımı mikroorganizmaların gelişmesini engelleyebilir ve hatta onları etkisiz hale getirebilir (Gysemans vd. 2007). Ancak, gıda yapısı ve çok kültürlü mikrobiyal etkileşimler gibi parametrelerin, mikrobiyal davranışı önemli ölçüde etkileyebileceği de unutulmamalıdır (Yoon vd. 2011, Skjerdal vd. 2021).

Tuz, gıdalarda kullanılan en yaygın koruyuculardan biridir. Gıdalardaki mikrobiyal gelişimi durduracak tuz sınırı 346 g/L (yani %34,6) olarak belirlenmiştir. İnsan sağlığı ve gıdanın duyusal özellikleri üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle tuzun tek başına engel olarak uygulanması söz konusu değildir (Rahman 2015). *L. monocytogenes*'in tuza karşı toleransı olan bir patojendir ve %10'luk NaCl solüsyonunda canlılığını sürdürebildiği bildirilmiştir. NaCl konsantrasyonunun %4 ve üzerinde olduğu ortamlarda *L. monocytogenes*'in canlılığını koruyabilme olasılığı azalır (Huang vd. 2022). Çok fazla

sodyum tüketmek, çeşitli hastalıklara yol açabilmekte ve yüksek tansiyon riskini artırmaktadır. Tuz içeriğinin azaltılması ise, gıda güvenliği açısından risk teşkil etmektedir (Shrestha vd. 2011). WHO günde maksimum 5 g NaCl tüketimini önermektedir, ancak çoğu Avrupa ülkesinde bu oran 8-12 g'a kadar çıkabilmektedir. Bu nedenle, WHO 2025 yılına kadar NaCl alımının %30 azaltılmasını öngörmektedir. Bu kapsamda genel olarak yaklaşımlar, işleme sırasında NaCl içeriğinin düşürülmesi veya NaCl'nin KCl gibi ikamelerle değiştirilmesi yönündedir (Rybicka vd. 2022).

Nisin gibi doğal antimikrobiyallerin engellerler teknolojisi içinde yer alan gıda koruma tekniklerine ilave edilmesi de uygulanabilecek bir diğer seçenektir. Nisin ile birlikte organik asitler, tuzlar veya diğer faktörlerin kombine bir şekilde uygulandığı engeller teknolojisi, *L. monocytogenes* kontrolü için etkin olan uygulamalar arasındadır (Boziaris vd. 2007). Düşük ile orta tuz konsantrasyonunun *L. monocytogenes*'e karşı nisinin etkisini artırdığı yönündeki bilgiler tartışmaya açık bir konudur. Bununla birlikte, günümüzde NaCl yerine diğer tuz bileşenlerinin kullanılması üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Boziaris vd. 2007). Birçok patojenin gelişmesini engellemek için pH da önemli bir parametre olarak görülür. 4,6'dan daha düşük pH sınırı güvenli veya düşük riskli olarak kabul edilir (Rahman 2015). Potasyum sorbatın ($C_6H_7KO_2$) inhibitör etkisi de pH'a bağlıdır. Belirli bir gelişme olasılığını elde etmek için pH 7'ye kıyasla pH 5,5'te daha düşük potasyum sorbat konsantrasyonlarının gerekli olduğu gösterilmiştir. pH'ın düşürülmesi, belirli bir gelişme olasılığını elde etmek için daha az potasyum sorbat kullanmasını sağlayacaktır (Khanipour vd. 2016a).

2.8 Matematiksel Modelleme

Matematiksel model, bir sistemin matematiksel kavramlar ve dil kullanılarak tanımlanması sürecidir. Model geliştirme süreci, matematiksel modelleme olarak ifade edilebilir. Çok çeşitli disiplinlerde kullanım potansiyeli bulunan matematiksel modelleme; bir sistemi açıklamaya, farklı bileşenlerin etkilerini incelemeye ve bir davranış hakkında öngörüde bulunmak için yardımcı olabilir. Kısaca model karmaşık bazı sistemlerin basitleştirilmiş bir açıklamasıdır (FAO ve WHO 2021).

Prediktif mikrobiyoloji, mikroorganizmaların gelişme kinetiklerinin, gıda muhafazasında kullanılan fiziksel ve kimyasal faktörlere (pH değeri, a_w değeri, sıcaklık, kimyasal koruyucular) bağlı olarak matematiksel modellerle ifadesini ve bu faktörlerin mikroorganizmaların gelişme kinetiği üzerindeki bireysel etkilerinin, istatistiksel olarak belirlenmesini içerir. Bu modeller üretim ve dağıtım aşamalarındaki risklerin tespitini ve buna bağlı olarak üretim, dağıtım ve soğuk zincirin optimizasyonunu sağlar. Veri toplama, veri analizi, matematiksel tanımlama ve doğrulama aşamalarından oluşur (Öncü 2012). Tahmine dayalı modeller, çeşitli koşullar altında mikrobiyal davranışı değerlendirmek içinde kullanılmıştır (Gwak vd. 2015, Ačai vd. 2021). Tahmine dayalı mikrobiyoloji, gıda ürünlerinin mikrobiyal gelişme tahmini, kalite kontrolü ve risk değerlendirmeleri için güçlü bir araçtır. Prediktif mikrobiyolojide, mikroorganizmaların çok sayıda çevresel faktöre (örneğin sıcaklık, pH, su aktivitesi) gelişme tepkilerini tahmin etmek için matematiksel modeller kullanılır (Jia vd. 2020). Tahmine dayalı gıda mikrobiyolojisi modelleri, mikrobiyal gıda güvenliğinin değerlendirilmesini ve yönetimini kolaylaştırabilir. Daha da önemlisi, saklama koşullarının ve ürün özelliklerinin birleşik etkisi, başarıyla doğrulanmış modeller tarafından tahmin edilebilir (Dalgaard ve Mejlholm 2019).

Gıdalardaki mikrobiyal tepkileri nicel olarak tanımlamak için kullanılan matematiksel denklemler olan modeller, depolama ve dağıtım sırasında işleme operasyonlarında herhangi bir zaman ve sıcaklıkta patojen yoğunluğundaki değişimleri tahmin etmek için kullanılabilir. Geleneksel mikrobiyolojik teknikler zaman alıcıdır ve numuneleri ön işleme tabi tutmak için bir ön zenginleştirme adımı gerektirir. Tahmine dayalı modeller ise gıda kaynaklı patojenlerin gıdadaki gelişmesinin değerlendirilmesini hızlı ve ekonomik olarak sağlayabilir. Tahmine dayalı mikrobiyoloji, gıda bozulmalarının ve/veya gıda kaynaklı patojenik mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen faktörlerin kombinasyonlarına ilişkin deneysel verileri birleştirir (Lee vd. 2014, Possas vd. 2021).

Tahmine dayalı mikrobiyoloji modelleri, kinetik modeller ve olasılık modelleri olarak ikiye ayrılabilir. Kinetik modellerde, gıda ürünlerinin mikrobiyolojik ömrü, yani gıdadaki

mikroorganizma sayısının belirli bir değerden daha az olduğu süre hesaplanır. Olasılık modellerinde ise bir mikroorganizmanın gelişip gelişemeyeceği, mikrobiyal gelişmenin belirli bir koşul aralığında gerçekleşip gerçekleşmeyeceği belirlenir ve düşük veya sıfır gelişme olasılığı olan saklama koşulları belirlenir (Tienungoon vd. 2000, Valero vd. 2006).

Bir patojenin gelişmeyi başlatma potansiyeli üzerindeki hafif baskıların etkisi, olasılık modelleriyle açıklanabilir. *L. monocytogenes* dahil olmak üzere patojenik bakterilerin gelişme/gelişmeme arayüzünü açıklayan çok sayıda olasılık modeli vardır (Belessi vd. 2011). Gelişme/gelişmeme arayüzünün modellenmesi, engel kavramına niceliksel bir yaklaşım sağlayarak, test edilen faktörlerin gıda güvenliği üzerindeki etkinliğinin daha gerçekçi bir şekilde değerlendirilmesine yol açar. Matematiksel gelişme/gelişmeme modellemesi, gıda muhafazası ve güvenliği için uygulanan engellerin etkilerini ve etkileşimlerini ölçmek için doğru bir araç olarak görülmektedir (Boziaris ve Nychas 2006). Mikrobiyal gelişme/gelişmeme arayüz modelleri, çeşitli engellerin gelişme olasılığı üzerindeki birleşik etkisini ölçer ve gelişmenin durduğu kombinasyonları tanımlar. Sonuç olarak, bu tür modeller, gıda güvenliği risklerinin daha gerçekçi bir şekilde tahmin edilmesine yol açabilir ve daha güvenli gıda ürünlerinin üretilmesine olanak tanıyan süreçlerin geliştirilmesi için yararlı nicel veriler sağlayabilir (Koutsoumanis vd. 2004).

Spesifik gelişme hızı ve gecikme fazı süresi büyük ölçüde sıcaklığa bağlı olduğundan, sıcaklık, gıdanın mikrobiyal bozulma reaksiyonlarında önemli bir faktördür (Gallo vd. 2007). Hem gözlemler hem de model tahminleri, beklendiği gibi gelişmenin sıcaklıkla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Rosshaug vd. 2012). İnokülüm miktarı, mikrobiyal gelişme kinetiği çalışmalarında nadiren etkili bir faktör olarak kullanılmasına rağmen, mikrobiyal gelişmeyi etkileyebileceğini gösteren kanıtlar vardır (Koutsoumanis ve Sofos 2005).

Mikroorganizmaların koruyucu madde kombinasyonlarına gelişme tepkisini nicel olarak açıklamak için de matematiksel modelleme sıklıkla kullanılmaktadır. Modelleme,

engelleyici faktörlerin etkileri ve bunların etkileşimleri hakkında bilgi sağlar. Olasılık modelleri, özellikle engel teknolojisinin uygulanması için niceliksel bir yol sağlayarak, gıdanın mikrobiyal güvenliğini değerlendirmede yararlıdır. Herhangi bir gelişme, gıda kaynaklı hastalık veya zehirlenme olasılığını gösterebileceğinden mikroorganizmaların gelişip gelişemeyeceğinin tahmini, (gelişme oranını tanımlayan) kinetik modellere tercih edilir. Enfektif sayısı yüksek olan bazı patojenik veya gıda zehirlenmesine neden olan mikroorganizmalar için gelişme hızının modellenmesi daha önemli olabilir. Bir gıdadaki belirli mikroorganizmaların gelişme potansiyelini tahmin edebilmek (zaman alıcı ve pahalı deneme testlerine ihtiyaç duymadan) veya gelişmeyi engelleyen ürün formülasyonları oluşturmak, gıda endüstrisi için ekonomik açıdan da önemlidir. Gelişme olasılığı, koruyucu madde konsantrasyonlarının fonksiyonları olarak tahmin edilebilir veya tersine, belirli bir gelişme olasılığını sağlayabilen koruyucu seviyeleri ayarlanabilir. Bu yaklaşım, hedef bir mikroorganizmanın gelişmesini önleyen koruyucu faktörlerin spesifik kombinasyonlarının önceden tanımlanabilmesini sağlar (Khanipour vd. 2016a).

Mikrobiyal gelişmenin meydana gelme olasılığını ölçerek gelişmeyi önleyen faktörlerin kombinasyonlarını tanımlayan gelişme/gelişmeme arayüz modelleri, daha güvenli gıda ürünlerinin üretilmesine izin veren ve gıda güvenliği risklerinin daha gerçekçi tahminleri için bilgi sağlayan süreçlerin geliştirilmesinde ve gıda güvenliği düzenlemelerinde faydalı olabilir (Koutsoumanis ve Sofos 2005). Minimum düzeyde işlenmiş gıdaların mikrobiyal kontaminasyona maruz kalma ihtimallerinin değerlendirilebilmesi için özellikle gelişme/gelişmeme modellerinin kullanımı faydalı olabilecektir. Ancak, birçok patojen düşük enfektif dozlarda da enfeksiyona neden olabilir. Kontaminasyon seviyesinin gelişmeyi önemli ölçüde etkilediği gözlemlendiğinden, hücre yoğunluğu, modelleme işlemi sırasında dikkate alınması gereken bir faktördür (Vermeulen vd. 2009). Ayrıca gıda matriksi, mikrobiyal rekabet, gıda bileşenleri, antimikrobiyal bileşikler vb. gibi önemli birçok gıda parametresinin göz önünde bulundurulmaması nedeniyle bu modeller aslında gıdada mikrobiyal gelişim hızının tam olarak temsil edildiği ortamları baz almamaktadır (Öncü 2012).

Kinetik matematiksel modeller, gıda ürünlerinin mikrobiyolojik raf ömrünü hesaplarken, olasılıksal modeller bir mikroorganizmanın farklı koşullar altında gelişme olasılığını

tahmin etmek için kullanılır. Lojistik regresyon, patojenik bakterilerin gelişmesi ve gelişmemesi arasındaki sınırları modellemek için yararlı bir yöntem olabilir. Gıda kaynaklı patojenlerin gelişmesi ve gelişmemesi arasındaki sınırların tahmini, olasılıksal modellerle elde edilebilir (Yoon vd. 2011). Özellikle, işlenmiş gıdalarda gıda kaynaklı patojenlerin gelişmesini engellemek için $NaNO_2$ (Sodyum Nitrit) ve NaCl gibi koruyucuların ideal konsantrasyon kombinasyonlarını belirlemek için olasılıksal modellerin kullanılması uygun bulunmuş ve farklı çevresel koşullar altında bakterilerin gelişmesi ve gelişmemesi arasındaki arayüzleri üretmek için lojistik regresyon analizi ile olasılıksal bir model geliştirilmiştir (Gwak vd. 2015).

Birincil modeller, maksimum spesifik gelişme hızı verildiğinde zamanın bir fonksiyonu olarak bakteri konsantrasyonunu tahmin etmek için kullanılabilir (Rosshaug vd. 2012). Weibull tipi ve değiştirilmiş Gompertz modelleri gibi diğer kinetik modeller de *L. monocytogenes*'in farklı ısıl işlem koşulları altında hayatta kalma eğrilerini tanımlamak için kullanılmıştır (Shi vd. 2015). Birincil modeller zaman içinde patojen seviyelerindeki değişiklikleri tahmin etmek için kullanılmıştır, ikincil modeller ise gıdaların patojen sağkalımı üzerindeki dış veya içsel faktörlerinin etkisini ölçmek için kullanılmaktadır. Gelişme sınırı modellerinin uygulanmasının amacı, hedef patojenlerin gelişmesini veya inaktivasyonunu üreten fiziko-kimyasal özelliklerin ve/veya çevresel koşullarının kombinasyonlarını tanımlamaktır. İkili lojistik regresyonlar, *L. monocytogenes*'in gelişme olasılığını tahmin etmek için bir model geliştirmek için kullanılmıştır (Possas vd. 2021). Gelişme/gelişmeme (Growth/No growth) modelleri, gelişmeye izin veren veya engelleyen çevresel faktörlerin kombinasyonlarını tanımlama yöntemi olarak kullanılabilir (Schvartzman vd. 2010). Son zamanlarda, gelişme/gelişmeme arayüzleri, sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonu gibi gıdayla ilgili ortamların bir fonksiyonu olarak kapsamlı bir şekilde modellenmiştir (Hu vd. 2022). Çeşitli gıda türlerinde ve farklı modelleme teknikleri kullanılarak birçok mikroorganizma için gelişme/gelişmeme arayüzleri halihazırda modellenmiştir (Gysemans vd. 2007). Kullanılan model, parametrelerine göre doğrusalsa bu modelin parametreleri doğrusal regresyon kullanılarak bulunabilir. Parametrelerine göre doğrusal modeller için kullanılabilecek güçlü bir doğrusal regresyon aracı Excel'de yer alan veri çözümleme uygulamasıdır. Doğrusal olmayan modeller için ise Excel'deki çözücü aracı kullanılabilir (Leylak vd.

2020). Gıdalardaki mikroorganizmaların etkisizleştirme kinetiği genellikle doğrusal model kullanılarak tanımlanmaya çalışılır (Buzrul 2014).

2.8.1 Model geliştirme

Model geliştirme yöntemi, çalışmanın amacına göre değişkenlik göstermektedir. Bu aşamada amaç modelde tutulması veya çıkarılması gereken değişkenlerin belirlenmesidir. Bazen hangi değişkenin bağımlı değişkeni nasıl etkilediğinin tespiti, bazen de bilinen bir ya da birden fazla değişkenin bağımlı değişkeni nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanabilir. Önemli olan sonucu etkileyecek bu değişkenlerin model oluşturulurken dikkate alınmasıdır (Polat 2017).

Mikrobiyal inaktivasyon için birinci dereceden kinetik, 100 yıldan daha uzun bir süre önce elde edilmiştir. Mikroorganizmaların inaktivasyon kinetiklerini modellemek, gıda ürünlerinin güvenliğini açıklamak ve tahmin etmek için önemlidir. Mikrobiyal inaktivasyonun kinetiği uzun bir geçmişe sahiptir ve mikrobiyal inaktivasyon süreçleri için geleneksel yaklaşım birinci dereceden kinetiği veya doğrusal modeli kullanmak olmuştur (Buzrul 2022). Günümüzde birçok mikrobiyal gelişme modeli önerilmiş ve kullanılmaktadır. Ancak bunlardan belki de en çok tercih edilenleri Gompertz, Baranyi ve Üç Fazlı Doğrusal modellerdir (Öksüz ve Buzrul 2021).

2.8.1.1 Modifiye Gompertz modeli

İlk kez Benjamin Gompertz (1779-1865) tarafından ortaya konan Gompertz Büyüme Modeli, gelişmenin belirli bir zaman döneminin başında ve sonunda en yavaş olarak tanımlandığı sigmoid bir fonksiyondur. Genelleştirilmiş lojistik fonksiyonun özel bir durumu olan Gompertz modeli, bitkilerin ve hayvanların büyümesi, tümör hücrelerinin büyümesi ve bakteri gelişmesi gibi alanlarda kullanılmıştır (Akan 2022). Gompertz modeli ilk defa 1825 yılında insanların ölüm oranını hesaplamak için kullanılmış bir denklem olup, sonraki yıllarda mikroorganizmaların besiyerlerindeki veya gıdalardaki

gelişme eğrilerini tanımlamak için Gompertz denklemi veya onun modifiye halleri uygulanmıştır. Gompertz denklemi 1990 yılında Zwietering ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir (Ariafar 2015). Gompertz büyüme modeli en yaygın kullanılan büyüme modellerinin başında gelmektedir (Gallo vd. 2007, Çığşar 2022).

2.8.1.2 Baranyi modeli

Baranyi ve Roberts (1994) tarafından önerilen bu model iç içe iki diferansiyel denklemden oluşmaktadır. Baranyi modelinde de tıpkı Gompertz modelindeki gibi bütün model parametreleri yer almaktadır (Öksüz ve Buzrul 2021).

2.8.1.3 Üç Fazlı Doğrusal model

Üç Fazlı Doğrusal (ÜFD) model gelişme evrelerinin her birinin birer doğru ile tanımlanmasından adını alır. ÜFD modeli, Buchanan vd. (1997) tarafından önerilmiştir (Öksüz ve Buzrul 2021).

2.8.1.4 Lojistik regresyon

Lojistik regresyon modelleri, gelişme/gelişmeme arayüzünü yumuşak bir geçiş bölgesi olarak tanımlayan, en sık kullanılan gelişme/gelişmeme modelleridir. Lojistik regresyon modelleri, kategorik bir yanıt değişkeni (yani, olağan aralık ölçeğinden ziyade bilgi kategorilerini yansıtan sonuçlara sahip bir değişken) ile bir dizi açıklayıcı değişken arasındaki ilişkiyi araştıran yaygın olarak kullanılan istatistiksel modellerdir (Gysemans vd. 2007). Lojistik regresyon tahmin edici bir analiz yöntemi olup, meydana gelecek riski 0 ile 1 arasında tahminlemektedir (Çatal 2021).

Lojistik regresyon tıbbi araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Prediktif gıda mikrobiyolojisi alanında, bakteriyel gelişme/gelişmeme arayüzünü açıklamak için lojistik

modeller geliştirilmiştir. Bu modellerde, veriler tipik bir binom veri setinde olduğu gibi 0-1 formatında sunulmuştur (Zhao vd. 2001). Lojistik regresyon analizinin kullanım amacı, istatistikte kullanılan diğer modeller gibi bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi, en az değişken ile en iyi uyuma sahip olacak biçimde tanımlayabilen, kabul edilebilir bir model kurmaktır. Lojistik modelin kullanılması 1845'li yıllara dayanmaktadır ve toplumdaki nüfus artışını matematiksel olarak ifade etmek için kullanılmıştır. Lojistik regresyon, tek değişkenli lojistik regresyon ve çok değişkenli lojistik regresyon olarak sınıflandırılabilir. Lojistik regresyon analizi sonucunda elde edilen sonuç modeli doğrusal olmayan bir fonksiyondur (Çokluk 2010).

Odds, oddsratio ve logit, lojistik regresyonda önemli temel terimlerdir. Odds; bir olayın görülme olasılığının, görülmeme olasılığına oranıdır. İki değişken arasındaki ilişkiyi özetleyen Oddsratio (OR); iki odds değerinin oranıdır. Logit ise Oddsratio oranının doğal logaritmasıdır (Baydemir 2014).

Lojistik regresyon yaklaşımı, olasılık ve gelişme/gelişmeme modellemesi için yaygın olarak benimsenmiştir (Rahman 2015). Gıda mikrobiyolojisinde lojistik regresyon bir veya daha fazla kontrol faktörü çalışıldığında bakterilerin gelişmesi ve gelişmemesi arasındaki sınırın modellenmesini sağlar (Valero vd. 2006).

2.8.2 Gelişme değerlendirmesi

Mikrobiyal gelişmenin varlığı/yokluğu, mikroplaka okuyucu cihaz kullanılarak tüm koşullarda türbidimetrik olarak ölçülmesiyle haftalık olarak izlenir. Optik Yoğunluk (OD: Optical Density) değeri sıfır zamanına göre en az 0,1 üzerinde artış gösterdiğinde, gelişme gösterdiği kabul edilir. Her muamele için sonuçlar, 0 (gelişme yok) ile 1 (gelişme var) arasında değişen bir gelişme olasılığı değeri olarak ifade edilir (Khanipour vd. 2016a). Gelişme yanıtı verileri lojistik regresyon ile analiz edilir (Boziaris ve Nychas 2006). En önemli etkileri seçmek için adım adım seçim yöntemiyle otomatik değişken seçim seçeneği kullanılır. Geliştirilen modellerin uyum iyiliği ölçütleri olarak Uyum indeksi, Hosmer-Lemeshow (HL) uyum iyiliği istatistiği ve maksimum yeniden ölçeklendirilmiş

R^2 istatistiği kullanılabilir (Koutsoumanis ve Sofos 2005). Uyumluluk indeksleri tahmin edilen olasılıklar ile gözlenen tepkiler arasındaki uyuşma derecesidir (Yoon vd. 2011).

Mikrobiyolojik sayımlarda ise (KOB/mL) gelişmenin olup olmadığını belirlemek için, *L. monocytogenes* koloni sayısında ilk inokülüme göre en az 1 $\log_{10}$ KOB/mL artış gösteren kombinasyonlara 1 (gelişme) değeri verilirken, *L. monocytogenes* hücre sayısında 1 $\log_{10}$ KOB/mL'den daha az artış gösteren kombinasyonlara 0 değeri verilmiştir (gelişme yok). 1 $\log_{10}$ birim eşiği, hücre sayımlarında 1 $\log_{10}$'dan fazla artışın genellikle önemli bir değişiklik olarak kabul edildiği varsayımına dayanarak bir modelin performansının değerlendirilmesi için gelişme olup olmadığını belirlemek için eşik olarak kullanılmıştır (Yoon vd. 2011, Gwak vd. 2015).

2.8.3 Model performansının değerlendirilmesi

Doğrusal regresyonda, modelin açıklama gücünü gösteren R^2, bağımlı değişkendeki farklılaşmanın bağımsız değişkenler tarafından ne kadarının açıklanabildiğini gösteren bir ölçüdür. Modelin açıklama gücü, R^2 1'e yaklaştıkça artar. Anlamlı değişkenler kadar model uyumu da önem ifade eder. Uyum iyiliği modelin bağımlı değişkeni tanımlamada ne derecede iyi olduğunu inceler. Model uyum iyiliğinin değerlendirilmesinde Pearson ki-kare ve sapma testi, HL testi ve sınıflandırma tablosu en çok tercih edilenlerdir. Pearson ve sapma istatistikleri (kritik) tablo değerinden büyük ve $p \leq 0,05$ ise modelin uyumlu olmadığı söylenir (Çatal 2021).

Regresyonda amaç farkların karelerinin toplamının (Sum of Square: SS_{Fark}) en aza indirilmesidir. SS_{Fark} değerinin serbestlik derecesine bölümü ile elde edilen MS (Mean square) ortalama kare değeri anlamına gelir. F-değeri bu iki değerin oranıdır. Eğer F-değeri yüksek ise bağımsız değişkenin bağımlı değişkeni tanımlamak için etkisi olduğu söylenebilir. Öte yandan "anlamlılık F-değeri" ne kadar düşük ise bağımsız değişkenin bağımlı değişkeni tanımlamak için kullanılabileceği anlamı da çıkar (Leylak vd. 2020).

Belirtme Katsayısı R^2; bir modelin veriye ne kadar iyi uyum sağladığının bir ölçüsüdür. Ayarlı R^2 (Düzeltilmiş R^2/R^2_{adj}) ise R^2 değerinin değiştirilmiş bir formudur. R^2'den farklı olarak parametre sayıları da devreye alınarak yeni gözlemler eklendiğinde modelin performansının ne olacağı ölçülmek istenir (Çığşar 2022).

R^2 değeri ya da belirleme katsayısı model uyumunu anlamak için yeterli değildir. R^2 değeri düşükse model uyumunda sorun vardır ancak R^2 değerinin yüksek olması model uyumunun iyi olduğunu göstermez. Bu yüzden modelin uyumunu değerlendirmek için farklı uyum ölçütlerini de incelemek en doğru yoldur. Ayrıca bazı kaynaklarda R^2 yerine ayarlı R^2 değerinin kullanılmasının daha uygun olduğu belirtilmekle birlikte, model uyumunun en uygun göstergesi modelin standart hata değeridir. Standart hata, Hata Kareler Ortalamasının Karekökü (Root Mean Square Error: RMSE) olarak da adlandırılır (Leylak vd. 2020). RMSE; MSE (Hata Kareler Ortalaması) değerinin kökünün alınması ile elde edilir. MSE ise gerçek değerler ile tahmin edilen değerler arasındaki farkın, kareleri toplamının, gözlem sayısına bölünmesi ile elde edilir. İyi uydurulmuş bir modelde MSE ve RMSE değerinin düşük olması beklenir (Çığşar 2022). RMSE değeri en önemli ve en doğru model uyum göstergesidir. Ayarlı R^2 değeri 1'e ne kadar yakın, RMSE değeri ise 0'a ne kadar yakın olursa model uyumu o kadar iyidir (Öksüz ve Buzrul 2021). Tahminlemede kullanılan modellerin uygunluğu genellikle RMSE ve R^2 değerine göre değerlendirilir. Daha düşük hata oranına sahip model, tahminlemede daha doğru olarak yorumlanırken, daha yüksek bir R^2 değeri verilerin seçilen model ile daha iyi tanımlandığını ifade etmektedir (Tosun 2022).

Lojistik Regresyon Analizinde en çok kullanılan temel ölçü, olabilirlik değeridir. -2lnL ya da -2log olabilirlik (-2log likelihood) bir model uyumu indeksidir. Lojistik regresyon, kestirilen model uyumunu olabilirlik değerinin -2 log'unu alarak ölçer. -2lnL'nin alabileceği en küçük değer sıfırdır ve mükemmel uyuma karşılık gelir yani uyum iyileştikçe -2lnL değeri düşer. Lojistik regresyon analizinde, elde edilen modelin sonuç değişkenini tanımlamakta ne kadar etkili olduğu modelin uyum iyiliği ile incelenir. Modelin veriye uyumunun iyi olup olmadığı Pearson ki-kare testi, HL testi ve sapma (deviance) istatistikleri gibi çeşitli istatistiksel yöntemlerle belirlenebilir (Çokluk 2010, Şenel ve Alatlı 2014).

1980-1982 yıllarında David Hosmer ve Stanley Lemeshow tarafından tasarlanan HL testi gözlenen ve beklenen olasılıklar arasındaki farkla birlikte lojistik regresyonda genel uyumun değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Testin sonuçlarının anlamlı çıkmaması ($p>0,05$) kurulan model ile veri uyumunun iyi olduğunu gösterir. Gözlenen değer ile beklenen değer arasında anlamlı fark olmaması modelin tahmin gücünün yüksek olduğu anlamına gelir. HL değeri, modelin ki-kare değerinin -2lnL değerine bölünmesiyle de elde edilir (Baydemir 2014, Çatal 2021). Uyum eksikliği olup olmadığını gösteren HL istatistiği küçük bir değer (veya buna karşılık gelen yüksek bir *p* değeri) alırsa, model verilere iyi uyum sağlar (Khanipour vd. 2016a).

Modellerin öngörü gücü, c-değeri (uyum indeksi) veya doğru tahmin yüzdesi ile ölçülebilir. Tahmin (Öngörü) gücü, c değeri 1'e eşitse veya doğru tahmin yüzdesi %100'e eşitse mükemmeldir. Doğru tahmin yüzdesi, tahmin edilen değerlerin gözlemlenen değerlerle ne ölçüde eşleştiğini gösterir. Her ikisi de tahmin edilen gelişme olasılığının gözlemlenen gelişme ile yakın uyumunu gösterir. Gözlenen gelişme/gelişme olmaması verilerini model tahminleri ile karşılaştırmak için, 0,1, 0,5 ve 0,9 seviyelerindeki tahmin edilen olasılıklar, koruyucu konsantrasyonlarının fonksiyonları olarak hesaplanır (Khanipour vd. 2016a). Örneğin 0,5 olasılığı uygun bir seçim değilse, daha büyük bir güvenlik marjının tahmin edilmesi gerekiyorsa 0,1 olasılığı gibi daha ihtiyatlı değerler kullanılabilir (Yoon vd. 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışma kapsamında bakteriyel kültür olarak, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan ve tüketime hazır gıdalardan izole edilerek moleküler tanımlaması yapılmış olan 29 adet *L. monocytogenes* suşu kullanılmıştır. *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ise çalışmada referans bakteri olarak kullanılmıştır.

3.1.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan besiyerleri ve kimyasallar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Gıda ortamı olarak ise piyasadan temin edilmiş olan UHT süt ve herhangi bir katkı içermeyen ev yapımı et suyu kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	Katalog Numarası
Tryptic Soy Broth (TSB)	Merck, 1.05459.0500
Tryptic Soy Agar (TSA)	Merck, 1.05458.0500
Nisin	Nisin from *Lactococcus lactis*, Sigma, N5764
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck, 1.06404.1000
Potasyum Klorür (KCl)	Merck, 1.04936.1000
Potasyum Sorbat ($C_6H_7KO_2$)	Merck, 1.05119.1000
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Gliserol	Merck, 1.04092.2511

0,02 N HCl hazırlanması;

%37'lik hidroklorik asit çözeltisinden 100 mL 0,02 N HCl hazırlamak için 165 µL HCl çözeltisi 100 mL saf su ile karıştırılarak otoklavda 121 °C de 15 dk sterilize edilmiştir.

10 mg/mL stok nisin çözeltisi hazırlanması;

10 mg/mL derişiminde stok Nisin çözeltisi hazırlamak için 0,1 g %2,5 saflıktaki toz Nisin tartılarak 10 mL 0,02 N HCl çözeltisinde çözündürüldükten sonra 0,45 µm por çaplı enjektör filtreden (Minisart® Syringe Filter, Polyethersulfone (PES), Sartorius, Almanya) geçirerek sterilize edilmiş, -20 °C de muhafaza edilmiştir. Steril 0,02 N HCl ile istenilen konsantrasyona dilüe edilerek kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan tüm stok *L. monocytogenes* suşları, çalışma boyunca %20 gliserol içeren TSB ortamda -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Tez çalışması süresince kullanılacak kültürler TSB ortamında, 37 °C'de 18 h aktifleştirildikten sonra hücre yoğunlukları istenilen düzeylere (10^3, 10^4, 10^5, 10^6 KOB/mL) ayarlanarak kullanılmıştır.

3.2.2 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) bir test suşunun, *in vitro* koşullar altında, gözle görülür gelişmesini tamamen önleyen antibakteriyel ajanın en düşük konsantrasyonudur. Genellikle mg/L (µg/mL) cinsinden ifade edilir. MİK tayini için katı ve sıvı ortamda seyreltme yöntemleri uygulanır (Kowalska-Krochmal ve Dudek-Wicher 2021). Tez çalışmamızda tüm suşların MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI M-11) rehberine göre 96 kuyucuklu mikroplakalarda uygulanmıştır. Pozitif kontrol

kuyucuğu ile karşılaştırıldığında, gözle görünür üremenin olmadığı en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir (Yüksel 2012, Aelenei vd. 2019, Parvekar vd. 2020, Taner 2021). Mikrodilüsyon yöntemi ile 29 adet *L. monocytogenes* ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için 2 paralelli olacak şekilde aşağıdaki protokol izlenmiştir;

1. 100 µL TSB besiyerini içeren kuyuların ilk sırasına son konsantrasyon 4096 µg/mL olacak şekilde, 8192 µg/mL stok nisin çözeltisinden 100 µL eklenmiştir.
2. İlk kuyudan başlanarak bir sonraki kuyuya 100 µL aktarılarak her kuyuda 2'nin katları şeklinde azalan konsantrasyonlarda nisin içeren TSB besiyeri olacak şekilde seri dilüsyonlar yapılmıştır.
3. Dilüsyon sonrasında negatif kontrol kuyuları hariç tüm kuyulara, 18 h'lik aktif kültürlerden TSB besiyerinde optik yoğunluk (Optical Density: OD) değeri spektrofotometre (Shimadzu, Japan) ile 625 nm de 0,08 ile 0,13 absorbans değerleri arasında olacak şekilde ayarlanmış ve ~10^8 KOB/mL yoğunluğundaki kültürlerden 10 µL eklenerek mikroplakalar 37 ºC de 18 h inkübasyona bırakılmıştır.
4. Pozitif kontrol olarak sadece TSB besiyeri içeren kuyuya hazırlanan bakteri süspansiyonundan eklenmiştir. Negatif kontrol (kontaminasyon kontrolü) olarak sadece TSB besiyeri kullanılmıştır.
5. İnkübasyon sonrası bakteri gelişmesinin gözlemlenmediği, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük nisin konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen MİK değerleri sonucunda en düşük nisin konsantrasyonuna sahip MİK değerini gösteren suşlar içinden 2 tane (*L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* 241-1P) ve en yüksek nisin konsantrasyonuna sahip MİK değerini gösteren suşlar içinden ise yine 2 tane (*L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 151-1P) olmak üzere toplam 4 adet suş seçilmiştir. Elde edilen MİK değerlerine göre seçilen *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P, *L. monocytogenes* 151-1P, *L. monocytogenes* 241-1P suşları ile referans suş olarak *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu kullanılarak bundan sonraki çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.3 Deney tasarımı

3.2.3.1 *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme hızlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

MİK değerleri esas alınarak seçilen 4 *L. monocytogenes* suşu ile *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişim kinetiğini belirlemek için 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılmıştır. 18 h'lik aktif kültürlerin suş yoğunlukları 10^2 ile 10^7 KOB/mL arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Kültür ortamlarının 37 °C'de 8 h'lik inkübasyon süresince mikroplaka okuyucu cihazda (BioTek Elisa reader, µQuant, BioTek Instruments, Inc., USA), 600 nm'de yarım saatte bir ölçümleri yapılmıştır. 3 tekerrür olarak yapılan çalışmada, inkübasyon öncesi (t_0) ve OD ~0,15 ABS (0,13-0,18 ABS) değerine ulaştığında yayma kültürel sayım yöntemi ile koloni sayımları yapılmıştır. OD değerinin 0,15 ABS olduğu zaman tespit edilmiş ve ölçülen OD değerleri kullanılarak, suşların gelişme hızları aşağıda formülü verilen Denklem (1) ile belirlenmiştir:

$$t_{OD} = \lambda + \frac{2{,}303 \cdot [\log_{10} N_{OD} - \log_{10} N_0]}{\mu} \qquad (1)$$

t_{OD} : OD değerinin 0,15'e eşit olduğu zamandır (h), yani tespit süresi (TTD)
λ : Gecikme süresi (h)
$\log_{10}N_{OD}$: OD=0,15 iken *L. monocytogenes* sayısı ($\log_{10}$ KOB/mL)
$\log_{10}N_0$: *L. monocytogenes*'in başlangıç sayısı ($\log_{10}$ KOB/mL)
μ : Spesifik gelişme hızı (h^{-1}).

Denklem (1)'den elde edilen gelişme hızları temel alınarak, *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P suşları seçilmiştir. Seçilen bu iki suş ile *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu için 10^4 KOB/mL başlangıç hücre yoğunluğunda 37 °C sıcaklıkta 8 h'lik inkübasyon süresince yarım saatte bir koloni sayım işlemi yapılmış ve böylelikle

gelişme hızları hesaplanmıştır. Mikroplaka okuyucu verileriyle Denklem (1)'den elde edilen gelişme hızı sonuçlarının koloni sayım yöntemiyle de kontrolü sağlanmıştır.

Mikrobiyal gelişme eğrilerini tanımlamak için en sık kullanılan üç birincil model (Gompertz, Baranyi ve Üç Fazlı Doğrusal modeller), *L. monocytogenes*'in üç farklı sabit sıcaklık gelişme verisine uygulanmıştır (Öksüz ve Buzrul 2021). Baranyi, modifiye Gompertz ve ÜFD modellerinin eklendiği ücretsiz bir Excel yazılım dosyası olan ÖK-BUZ GRoFiT, **https://mmf.gidatarim.edu.tr/en/ok-buz-grofit** adresinden indirilerek mikrobiyal sayımı modellemek için kullanılmıştır. İki versiyonu olan bu aracın ikinci versiyonu (**https://mmf.gidatarim.edu.tr/ok-buz-grofit**) hem Türkçe hem de İngilizce olarak mevcuttur. ÖK-BUZ GRoFiT'deki Baranyi modeli, DMFit'teki altı parametreli modele 4 parametreli bir alternatiftir. Bununla birlikte lag, üstel ve durağan fazlara sahip gelişme verileri ile bu Excel araçları için neredeyse aynı uyumlar elde edilebilmektedir (Öksüz ve Buzrul 2021). En yüksek gelişme hızına sahip iki suş ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu, gelişme sınırları çalışmasında kullanılmıştır.

3.2.3.2 Farklı stres faktörlerine bağlı olarak *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

Farklı sıcaklık (4, 20 ve 37 °C), tuz, nisin (0 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL) ve başlangıç konsantrasyonu (3, 4, 5 ve 6 $\log_{10}$ KOB/mL) kombinasyonları ile sıvı besiyeri ortamında *L. monocytogenes*'in gelişme yeteneğini test etmek için tam faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında farklı tuz kombinasyonları olarak sodyum klorür (%0, %1, %2, %3 ve %4 w/v), potasyum klorür (%0, %1, %2, %3 ve %4 w/v) ve potasyum sorbat (%0, %0,05, %0,1, %0,15 ve %0,2 w/v) kullanılmıştır. NaCl için 900 veri noktası ile sonuçlanan üç replikasyon kombinasyonu yapılmıştır (3 farklı sıcaklık seviyesi × 5 farklı tuz seviyesi × 5 farklı nisin seviyesi × 4 farklı başlangıç konsantrasyon seviyesi × 3 replikasyon). Suşların başlangıç konsantrasyonu artıkça gelişme olasılığının arttığı, NaCl çalışması ile gözlemlendiğinden sonraki çalışmalarda 6 $\log_{10}$ KOB/mL başlangıç konsantrasyonu ile devam edilmiştir. Böylece KCl ve $C_6H_7KO_2$ tuzu için 225 veri noktası ile sonuçlanan (3 farklı sıcaklık

seviyesi × 5 farklı tuz seviyesi × 5 farklı nisin seviyesi × 3 replikasyon) kombinasyon uygulanmıştır. İnkübasyon sıcaklıkları; buzdolabı sıcaklığı, oda sıcaklığı ve optimum gelişme sıcaklığı baz alınarak seçilmiştir. Tez çalışmasında tuz ve nisin konsantrasyonları tespit edilirken, gıdalarda genellikle kullanımına izin verilen düzeyler tercih edilmiştir. Başlangıç suş yoğunluğu ise gıdalarda beklenen kontaminasyon seviyesine yakın olması bakımından 3 ve 4 $\log_{10}$ KOB/mL ve daha yüksek seviyeler için ise 5 ve 6 $\log_{10}$ KOB/mL olarak uygulanmıştır. Hazırlanan tüm kombinasyonların 2 ay boyunca haftada bir OD ölçümleri yapılmıştır. Gelişme, 600 nm'de ölçülen OD değerinde 0,1 birimden yüksek bir artış olarak kabul edilmiştir. Gelişme veya gelişme olmaması sırasıyla 1 veya 0 değeri verilerek puanlanmıştır. Veriler, SPSS yazılımı kullanılarak bir lojistik regresyon modeli kullanılarak değerlendirilmiştir (Boziaris vd. 2007, Khanipour vd. 2016a, Leylak ve Buzrul 2020).

3.2.3.2.1 Farklı sıcaklık ve nisin konsantrasyonlarında gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

Farklı nisin konsantrasyonlarında *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının gelişme sınırlarını belirlemek amacıyla 3 tekerrürlü olarak çalışma yapılmıştır. Sıvı besiyerinde 10^3 ile 10^6 KOB/mL arasında başlangıç suş yoğunlukları için, 0 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL nisin konsantrasyonları kullanılmıştır. 2 ay boyunca 4 °C, 20 °C ve 37 °C sıcaklıklarda inkübasyon süresince mikroplaka okuyucu cihaz ile 600 nm dalga boyunda haftada bir yapılan ölçümlerle *L. monocytogenes* suşlarının gelişme durumu incelenmiştir. Başlangıç durumundaki koloni sayısı (N_0) ve OD ölçümlerinde artışın görüldüğü noktadaki koloni sayısı TSA besiyerinde yayma ekim yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3.2.2 Farklı sıcaklık, NaCl, nisin ve başlangıç inokülüm değerlerinde *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

NaCl tuzunun *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının gelişimine etkisini belirlemek amacıyla 3 tekerrürlü olarak %0, %1, %2, %3 ve %4 NaCl içeren sıvı besiyerinde çalışma yapılmıştır. Çalışmada 10^3 ile 10^6 KOB/mL arasında başlangıç suş yoğunlukları ile 0 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL nisin konsantrasyonlarının NaCl konsantrasyonlarıyla kombine etkisi incelenmiştir. 2 ay boyunca 4 °C, 20 °C ve 37 °C sıcaklıklardaki inkübasyon süresince mikroplaka okuyucu cihaz ile 600 nm dalga boyunda haftada bir yapılan ölçümlerle *L. monocytogenes* suşlarının gelişme durumu incelenmiştir (Boziaris ve Nychas 2006). Başlangıç durumundaki koloni sayısı (N_0) ve OD ölçümlerinde artışın görüldüğü noktadaki koloni sayısı TSA besiyerinde yayma ekim yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3.2.3 Farklı sıcaklık, KCl ve nisin konsantrasyonlarında *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

KCl tuzunun *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının gelişimine etkisini gözlemlemek amacıyla %0, %1, %2, %3 ve %4 KCl içeren sıvı besiyerinde, 10^6 KOB/mL başlangıç hücre yoğunluğunda 3 tekerrürlü çalışma yapılmıştır. Çalışmada 0 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL nisin konsantrasyonları ile KCl konsantrasyonlarının kombinasyonu kullanılmıştır. 2 ay boyunca 4 °C, 20 °C ve 37 °C sıcaklıklarda inkübasyon süresince mikroplaka okuyucu cihazda 600 nm dalga boyunda haftada bir yapılan ölçümlerle *L. monocytogenes* suşlarının gelişme durumu incelenmiştir (Boziaris vd. 2007). Başlangıç durumundaki koloni sayısı (N_0) ve OD ölçümlerinde artışın görüldüğü noktadaki koloni sayısı TSA besiyerinde yayma ekim yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3.2.4 Farklı sıcaklık, $C_6H_7KO_2$ ve nisin konsantrasyonlarında *Listeria monocytogenes* suşlarının gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

Potasyum sorbat tuzunun *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının gelişimine etkisini belirlemek amacıyla 10^6 KOB/mL başlangıç hücre yoğunluğu için, 3 tekerrürlü olarak çalışma yapılmıştır. %0, %0,05, %0,1, %0,15 ve %0,2 $C_6H_7KO_2$ içeren sıvı besiyerinde 0 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL nisin konsantrasyonlarının kombine etkisi araştırılmıştır. 2 ay boyunca 4 °C, 20 °C ve 37 °C sıcaklıklarda inkübasyon süresince mikroplaka okuyucu cihazda 600 nm dalga boyunda haftada bir yapılan ölçümlerle *L. monocytogenes* suşlarının gelişme durumu incelenmiştir (Khanipour vd. 2016a). Başlangıç durumundaki koloni sayısı (N_0) ve OD ölçümlerinde artışın görüldüğü noktadaki koloni sayısı TSA besiyerinde yayma ekim yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3.2.5 Gıda ortamı olarak süt ve et suyunda gelişme sınırlarının belirlenmesine yönelik deney tasarımı

Genel olarak, sıvı besiyerinde geliştirilen modeller gerçek gıda sistemlerinde doğrulanmalı ve pratikte uygulanmadan önce gerçek gıda ürünlerinde test edilmelidir (Khanipour vd. 2016a). Bu nedenle, yaptığımız çalışmaların gıda ortamında validasyonunu gözlemlemek amacıyla UHT süt ve katkısız ev yapımı et suyu kullanılarak çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları ile 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. %1,5 KCl veya %0,125 $C_6H_7KO_2$ ilaveli gıda ortamlarında (süt ve et suyu) 10^6 KOB/mL başlangıç suş yoğunluğunda ve 25 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL ve 250 µg/mL nisin konsantrasyonlarında suşların gelişim durumları incelenmiştir. 2 ay boyunca 8 °C ve 12 °C sıcaklıklardaki inkübasyon süresince haftada bir koloni sayımları yapılmıştır. Başlangıç durumdaki koloni sayısına göre 1 $\log_{10}$ KOB/mL'den fazla artış gelişme olarak kabul edilerek gelişme/gelişmeme durumu belirlenmiştir (Khanipour vd. 2016b).

3.2.3.3 Gelişme değerlendirmesi

Biesta-Peters vd. (2010) yaptıkları çalışma ile OD ölçümlerinin, çeşitli faktörlerin gelişme parametreleri üzerindeki etkisini araştırmada, bakteri kültürlerinin gelişme hızlarını ve gecikme (lag fazı) sürelerini türetmek için kullanılabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, koloni sayımı, kültürlerin gelişmesini araştırmak için her zaman iyi bir yöntemdir ve OD ölçümlerinde elde edilemeyen spesifik gelişme koşullarının etkisini test etmek ile gelişme parametrelerini oluştururken yeni yöntemlerin doğrulanmasını sağlamak için kullanılmaya devam edecektir.

Mikrobiyal gelişme, yani gelişmenin varlığı/yokluğu, 2 ay boyunca bir mikroplaka okuyucu ile ortamın optik yoğunluğu 600 nm'de ölçülerek haftalık olarak izlenmiştir. Tüm kombinasyonların bulunduğu ve *L. monocytogenes* ile inoküle edilmiş ortam vorteksle karıştırıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmış, pozitif ve negatif kontroller ile ölçümler yapılmıştır. İnoküle edilmemiş numuneler negatif kontrol olarak, farklı suş yoğunluklarında (10^3 KOB/mL, 10^4 KOB/mL, 10^5 KOB/mL ve 10^6 KOB/mL) bakteri ile inoküle, tuz veya nisin içermeyen sıvı besiyerleri (TSB) ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Optik yoğunluğun başlangıç zamanına göre en az 0,1ABS ve üzerinde artış gösterdiği durumlarda gelişme olduğu kabul edilmiş ve ayrıca gelişme aynı zamanda TSA besiyerine yapılan yayma kültürel sayım yöntemiyle de doğrulanmıştır. Özellikle düşük inokülasyonlarda (10^3 KOB/mL ve 10^4 KOB/mL) gelişme hem OD değerleri kontrol edilerek hem de plaka sayımları ile izlenmiştir. Daha yüksek başlangıç inokülümlerinde (10^5 KOB/mL ve 10^6 KOB/mL) ise gelişme, bazı kuyucuklar için plaka sayımlarıyla doğrulanmıştır. Besiyerinde 1 $\log_{10}$ artış görülmesi gelişme olarak kabul edilmiştir. Gelişme/ gelişmeme verileri lojistik regresyon kullanılarak modellenmiştir (Leylak ve Buzrul 2020).

3.2.3.4 Model geliştirme

L. monocytogenes'in gelişme veya gelişmeme tepkileri sırasıyla 1 veya 0 olarak değerlendirilmiş ve veriler, SPSS (Sürüm 22, Chicago, IL, ABD) kullanılarak bir lojistik regresyon modeline uydurulmuştur. Buna göre iki model önerilmiştir:

$$logit(p) = a_0 + a_1.T + a_2.Tuz + a_3.nisin + a_4.IC \quad (2)$$

$$logit(p) = b_0 + b_1.T + b_2.Tuz + b_3.nisin + b_4.IC + b_5.T.Tuz + b_6.T.nisin + b_7.T.IC + b_8.Tuz.nisin + b_9.Tuz.IC + b_{10}.nisin.IC \quad (3)$$

Burada p, 0–1 aralığında gelişme olasılığıdır (gelişme var = 1, gelişme yok = 0), logit(p) = ln[p/(1–p)] a_0–a_4, b_0–b_{10} modelin katsayılarıdır, T sıcaklıktır (°C), *Tuz* tuz konsantrasyonudur (% w/v), *nisin* nisin konsantrasyonudur (µg/mL) ve *IC L. monocytogenes*'in başlangıç konsantrasyonudur (log_{10} KOB/mL).

İlk model, ana etkilerle (sıcaklık, tuz, nisin ve başlangıç konsantrasyonu) mümkün olan en basit model olup, ikincisi, iki taraflı etkileşim terimleriyle daha karmaşıktır. Modellemede ilk olarak modeldeki tüm katsayılar ile regresyon uygulanmıştır, sonrasında herhangi bir katsayı (veya katsayılar) önemsiz ise (P>0,05), modelden çıkarılarak regresyon tekrarlanmıştır. Her regresyondan önce sadece bir önemsiz katsayı çıkarılmış ve bu, modelde hiçbir anlamsız katsayı kalmayana kadar tekrarlanmıştır, yani modelde kalan katsayıların tümü anlamlıdır (P≤ 0,05). Farklı gelişme olasılıkları (p = 0,1, 0,5 ve 0,9) için öngörülen gelişme/gelişmeme arayüzleri, Microsoft® Excel Solver kullanılarak çizilmiştir (Leylak ve Buzrul 2020).

Lojistik regresyon için SPSS (Versiyon 22, Chicago, IL, ABD) kullanılmış ve modellerin uyum iyiliği (i) – 2ln$L$ ve L optimumdaki olasılık, (ii) Hosmer– Lemeshow (HL) istatistiği (iii) maksimum yeniden ölçeklendirilmiş R^2 istatistiği ve (iv) uyumlu yüzde kullanılarak

karşılaştırılmıştır (Leylak ve Buzrul 2020). –2lnL istatistiği model uyumunun yeterliliği hakkında bir fikir vermezken modelleri uyum iyiliğine göre sıralamak için kullanılmaktadır. Küçük –2lnL değerleri daha iyi uyan modellere karşılık gelir. HL değeri, lojistik regresyon denkleminin verilere ne kadar iyi uyduğunu göstermektedir. HL istatistiği ne kadar küçük veya buna karşılık gelen P değeri ne kadar yüksekse, model verilere o derece uyuyor anlamına gelir. Maksimum yeniden ölçeklendirilmiş R^2, bağımsız değişkenlerin yanıt değişkenini tanımlamada ne kadar yararlı olduğunu gösterirken uyumlu yüzde, gözlemlenen ve uydurulan değerler arasındaki uyumu yansıtmak için kullanılmaktadır (Leylak ve Buzrul 2020).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 MİK Değerleri

Tez çalışması kapsamında 29 adet *L. monocytogenes* ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının nisine duyarlılıkları MİK değerleri belirlenerek incelenmiştir. Elde edilen 128 ile 4096 µg/mL arasında değişen MİK değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 *Listeria monocytogenes* suşlarının MİK değerleri

SUŞ KODU	**MİK DEĞERİ (µg/mL)**
L. monocytogenes 3Ç	1024
L. monocytogenes 7Ç	1024
L. monocytogenes 77-1	512
L. monocytogenes 88-3	2048
L. monocytogenes 100-1P	512
L. monocytogenes 104-1P	1024
L. monocytogenes 107-2	2048
L. monocytogenes 114-1P	256
L. monocytogenes 115-1P	512
L. monocytogenes 116-1P	1024
L. monocytogenes 120-3P	4096
L. monocytogenes 122-2P	2048
L. monocytogenes 123-3	1024

Çizelge 4.1 *Listeria monocytogenes* suşlarının MİK değerleri (devamı)

SUŞ KODU	**MİK DEĞERİ (µg/mL)**
L. monocytogenes 124-2P	1024
L. monocytogenes 127-4P	1024
L. monocytogenes 133-1P	2048
L. monocytogenes 134-1P	1024
L. monocytogenes 135-1	512
L. monocytogenes 136-1P	1024
L. monocytogenes 137-3P	512
L. monocytogenes 142-1	512
L. monocytogenes 150-3P	512
L. monocytogenes 151-1P	2048
L. monocytogenes 152-3P	2048
L. monocytogenes 197-1P	2048
L. monocytogenes 217-2P	1024
L. monocytogenes 219-3P	512
L. monocytogenes 241-1P	512
L. monocytogenes 287-1P	512
L. monocytogenes ATCC 7644	128

En yüksek, orta ve en düşük MİK değerlerine sahip suşlar arasından dört adet *L. monocytogenes* suşu seçilmiştir. Seçilen suşlardan *L. monocytogenes* 120-3P nisine (4096 µg/mL) en dirençli suş iken; *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* 241-1P

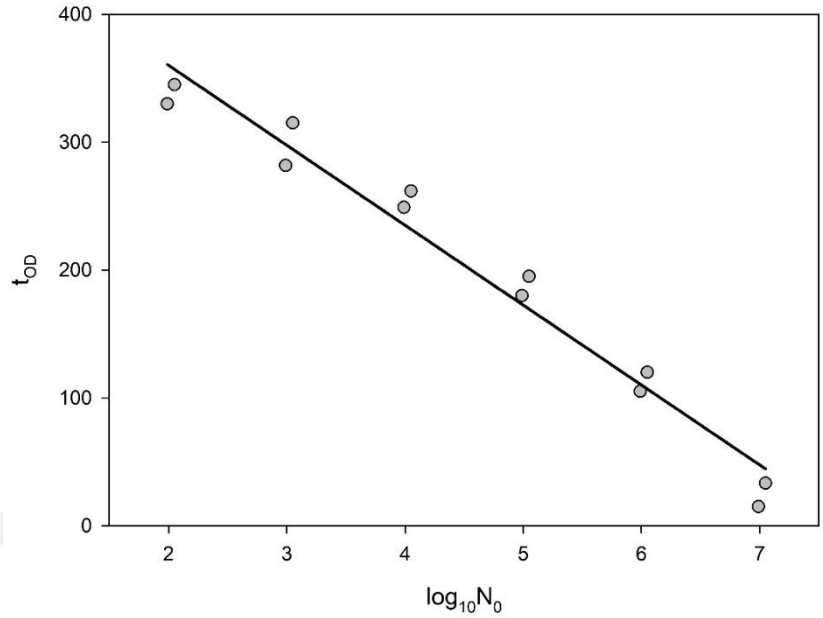
suşları 512 µg/mL ile en düşük MİK değerlerini sergilemiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes* ATCC 7644 128 µg/mL'lik MİK değeriyle nisine karşı en hassas suş olarak saptanmıştır. Seçilen bu suşlardan *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 151-1P et bazlı RTE gıdalardan, *L. monocytogenes* 137-3P sebze bazlı RTE gıdalardan ve *L. monocytogenes* 241-1P deniz ürünleri bazlı RTE gıdalardan izole edilmiştir.

Belirlenen MİK değerlerine göre *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P, *L. monocytogenes* 151-1P, *L. monocytogenes* 241-1P suşları ile referans suş *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile tez çalışmasına devam edilmiştir.

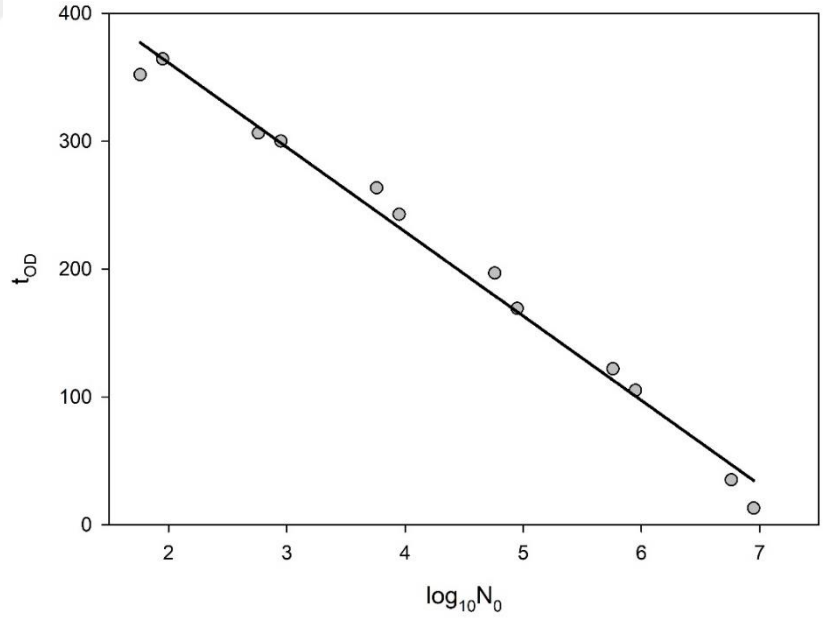
4.2 *Listeria monocytogenes* Suşlarının Gelişme Hızlarının Tespiti

L. monocytogenes 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P, *L. monocytogenes* 151-1P, *L. monocytogenes* 241-1P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için mikroplaka okuyucu ile yapılan ölçümlerle OD_{600} değerinin 0,15 olduğu noktadaki koloni sayıları belirlenmiştir. OD değerinin 0,15 olduğu zaman bakteri yükü (N_{OD}) değerleri suşlara göre değişmekle birlikte 8,0 ile 8,5 $\log_{10}$ arasında tespit edilmiştir. Denklem 1'e göre OD değerinin 0,15 olduğu zamana (t_{OD}) karşılık bakterinin başlangıç konsantrasyonu ($\log_{10}N_0$) çizilmiş ve doğrusal regresyon kullanılarak her bir suş için gelişme hızı hesaplanmıştır. Her bir suş için gelişme hızlarının tanımlanmasında Denklem 1'in uyumu Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

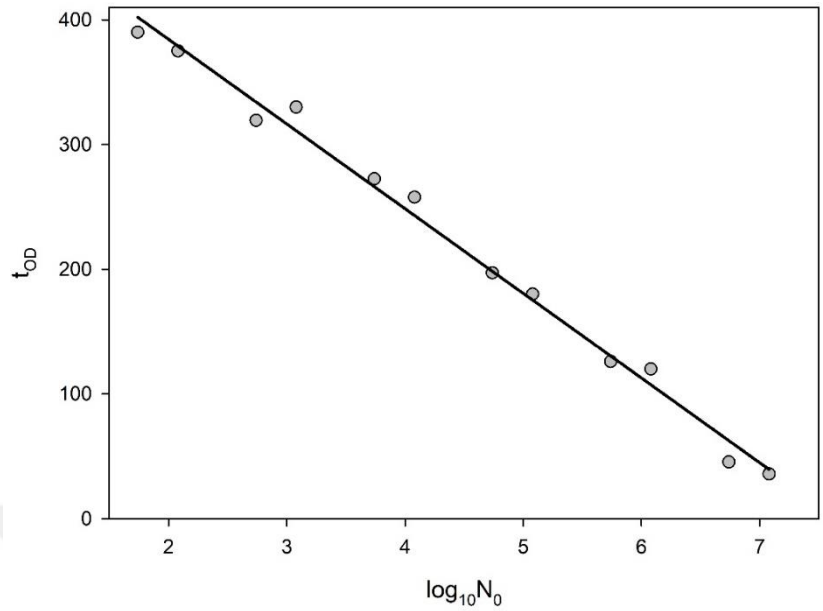
L. monocytogenes suşlarının Denklem (1)'e göre hesaplanan gelişme hızları ise Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. En yüksek ve en düşük gelişme hızları sırasıyla *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 151-1P suşları için 2,21 ve 2,04 h^{-1} olarak belirlenmiştir.



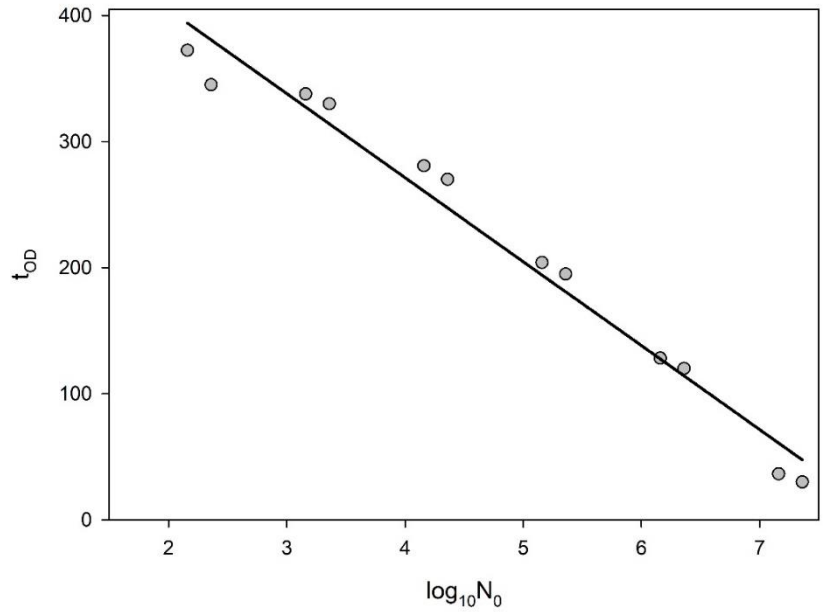
Şekil 4.1 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 120-3P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler)



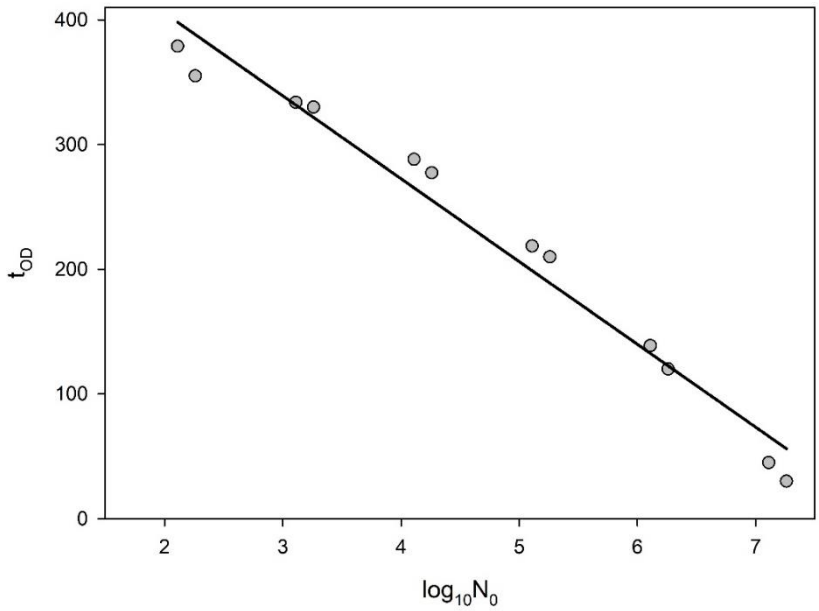
Şekil 4.2 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler)



Şekil 4.3 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 151-1P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler)



Şekil 4.4 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 241-1P suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler)



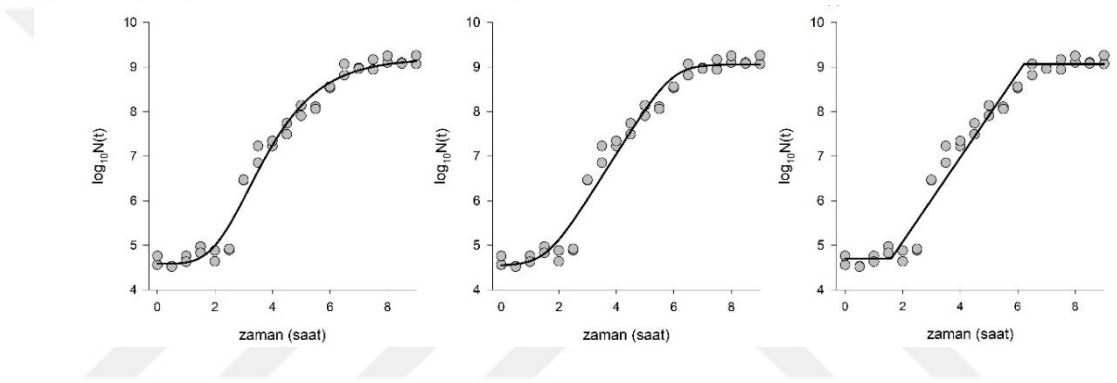
Şekil 4.5 İnokülüm miktarının logaritmasının bir fonksiyonu olarak bulanıklığa kadar geçen süre (gri daireler) ve sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme oranlarını belirlemek için Denklem (1)'in uyumu (siyah çizgiler)

Çizelge 4.2 *L. monocytogenes* suşlarının OD değerleri ile Denklem (1)'e göre hesaplanan gelişme hızları

Suş Kodu	**Gelişme hızı ($\log_{10}$KOB/mL/dakika)**	**Özgül gelişme hızı (h^{-1}) ± Standart Hata**	**R^2**	**Ayarlı R^2**
***L. monocytogenes* 120-3P**	0,01599	2,21± 0,13	0,9649	0,9614
***L. monocytogenes* 137-3P**	0,01514	2,09± 0,09	0,9863	0,9849
***L. monocytogenes* 151-1P**	0,01473	2,04± 0,04	0,9909	0,9899
***L. monocytogenes* 241-1P**	0,01501	2,07± 0,11	0,9734	0,9708
***L. monocytogenes* ATCC 7644**	0,01506	2,08± 0,11	0,9714	0,9685

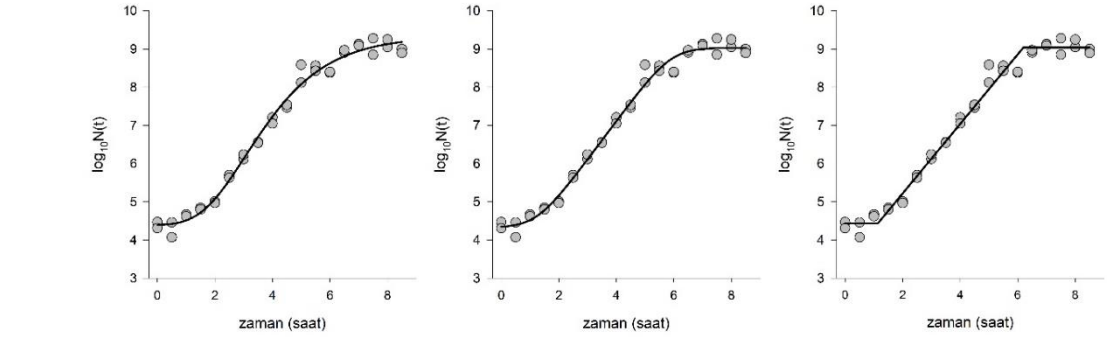
Sonuç olarak hesaplanan gelişme hızlarına göre, *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P suşlarının gelişme hızının diğer suşlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiş ve çalışmaya bu suşlarla devam edilmiştir. Ayrıca *L. monocytogenes* ATCC

7644 suşu da kontrol amaçlı kullanılmıştır. Tespit süresi (TTD: Time to Detection) verilerinin gelişme oranlarını koloni sayımlarıyla karşılaştırabilmek için seçilen üç suşa (*L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644) deneme planında belirtilen inkübasyon süreleri sonunda aynı zamanda koloni sayım yöntemi de uygulanmıştır. Mikrobiyal gelişme eğrilerini tanımlamak için bu suşların gelişme verisine Gompertz, Baranyi ve ÜFD modelleri de uygulanmıştır. *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının gelişme verilerini açıklamak için kullanılan üç modelin uyumu Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



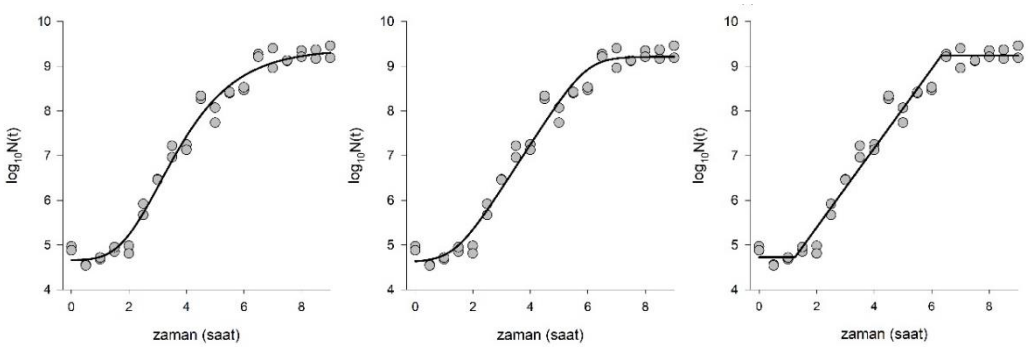
(a) (b) (c)

Şekil 4.6 Sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 120-3P suşunun koloni sayısı veya gelişme verileri (gri daireler) ile modifiye Gompertz denklemi (a), Baranyi modeli (b) ve Üç Fazlı Doğrusal modelin (c) uyumu (siyah çizgiler)



(a) (b) (c)

Şekil 4.7 Sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* 137-3P suşunun koloni sayısı veya gelişme verileri (gri daireler) ile modifiye Gompertz denklemi (a), Baranyi modeli (b) ve Üç Fazlı Doğrusal modelin (c) uyumu (siyah çizgiler)



(a) (b) (c)

Şekil 4.8 Sıvı besiyerinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun koloni sayısı veya gelişme verileri (gri daireler) ile modifiye Gompertz denklemi (a), Baranyi modeli (b) ve Üç Fazlı Doğrusal modelin (c) uyumu (siyah çizgiler)

Baranyi, Gompertz ve ÜFD modeller için elde edilen gelişme hızları Çizelge 4.3'te verilmiştir ve tüm modeller $R^2_{ayarlı}$>0,97 ile makul uyumlar üretmiştir. Gelişme hızları her iki yöntemde de (TTD ve koloni sayımı) çok yakın bulunmuştur ve 3 suş için iki yöntemin kontrolü sağlanmıştır. TTD deneylerine en yakın gelişme oranları, ÜFD modelin uyumundan elde edilmiştir. Bu model uyumuna göre, en yüksek gelişme hızı *L. monocytogenes* 137-3P suşu için 2,25 h^{-1}, ardından *L. monocytogenes* 120-3P suşu için 2,10 h^{-1} ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu için 2,04 h^{-1} olmuştur.

MİK çalışmasından elde edilen veriler, gelişme hızı çalışmasıyla karşılaştırılmıştır. Yüksek gelişme hızlarına sahip suşlar olan *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları gelişme/gelişmeme çalışması için kullanılmıştır.

Çizelge 4.3 *L. monocytogenes* suşlarının koloni sayısı verilerinden Baranyi, Gompertz ve Üç Fazlı Doğrusal modeller kullanılarak hesaplanan sıvı besiyerindeki gelişme hızları

Baranyi Modeli		
Suş Kodu	**Gelişme Hızı (h^{-1}) ± Standart Hata**	**$R^2_{ayarlı}$**
***L. monocytogenes* 120-3P**	2,36 ± 0,16	0,9744
***L. monocytogenes* 137-3P**	2,32 ± 0,09	0,9903
***L. monocytogenes* ATCC 7644**	2,30 ± 0,15	0,9765
Gompertz Modeli		
Suş Kodu	**Gelişme Hızı (h^{-1}) ± Standart Hata**	**$R^2_{ayarlı}$**
***L. monocytogenes* 120-3P**	2,89 ± 0,21	0,9811
***L. monocytogenes* 137-3P**	2,66 ± 0,13	0,9896
***L. monocytogenes* ATCC 7644**	2,76 ± 0,19	0,9822
Üç Fazlı Doğrusal Model		
Suş Kodu	**Gelişme Hızı (h^{-1}) ± Standart Hata**	**$R^2_{ayarlı}$**
***L. monocytogenes* 120-3P**	2,10 ± 0,11	0,9739
***L. monocytogenes* 137-3P**	2,25 ± 0,09	0,9868
***L. monocytogenes* ATCC 7644**	2,04 ± 0,10	0,9754

Tez çalışmasında seçmiş olduğumuz *L. monocytogenes* suşlarının TTD yöntemi ve koloni sayımı yöntemleriyle belirlenen spesifik gelişme hızlarının (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3) farklı çalışmalarda gözlemlenen gelişme hızlarıyla benzer olduğu görülmüştür (Biesta-Peters vd. 2010). *L. monocytogenes* 120-3P suşu, MİK sonuçlarına göre nisine karşı en dirençli suş olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1). Aynı zamanda TTD yöntemine göre ise en yüksek gelişme hızına (Çizelge 4.2) ve koloni sayısı verilerine göre de ikinci en yüksek gelişme hızına (Çizelge 4.3) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, gelişme/gelişmeme çalışmasına dahil edilmiştir. Öte yandan, *L. monocytogenes* 137-3P

suşu nisine karşı orta düzeyde duyarlılığa sahip olmasına rağmen (Çizelge 4.1), TTD yöntemine göre ikinci en yüksek gelişme hızına (Çizelge 4.2) ve koloni sayısı verilerine göre ise en yüksek gelişme hızına (Çizelge 4.3) sahip olduğu belirlenmiştir.

4.3 *Listeria monocytogenes* Suşlarının Sıvı Besiyerindeki Gelişmesi Üzerine Sıcaklık, NaCl, Nisin ve Başlangıç İnokülüm Değerlerinin Etkileri

Tez çalışmasında kullanılacak modeller [Denklem (2) ve (3)] doğrultusunda, elde edilen veriler söz konusu denklemlere uyarlanmıştır. Denklem (2) ve (3) için basit ve kompleks modellerin katsayı tahminleri, bunların standart hataları ve P değerleri *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için sırasıyla Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir. Yalnızca ana etkilere sahip en basit modelde [Denklem (2)], *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için NaCl terimi (a_2) istatistiksel olarak anlamsız (P>0,05) bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve 4.6). Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (2)'ye göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarıyla sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda belirlenen gelişme/gelişmeme arayüzleri 3-4-5-6 $\log_{10}$ başlangıç konsantrasyonları için sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Öte yandan, karmaşık model [Denklem (3)] için, anlamsız katsayılar modelden çıkarıldığında tüm ana etkiler denklemde tutulmuştur. Tüm uygunluk indeksleri (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6) ikinci model için daha iyi bulunduğundan *L. monocytogenes*'in tahmin edilen gelişme/gelişmeme sınırlarını çizmek için Denklem (3) ayrıca kullanılmıştır. Yüksek gelişme olasılığı (p= 0,9), eşit gelişme/gelişmeme olasılığı (p= 0,5) ve düşük gelişme olasılığı (p= 0,1) için sınırlar da Şekil 4.13 ve 4.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 *L. monocytogenes* 120-3P suşu için bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, NaCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler

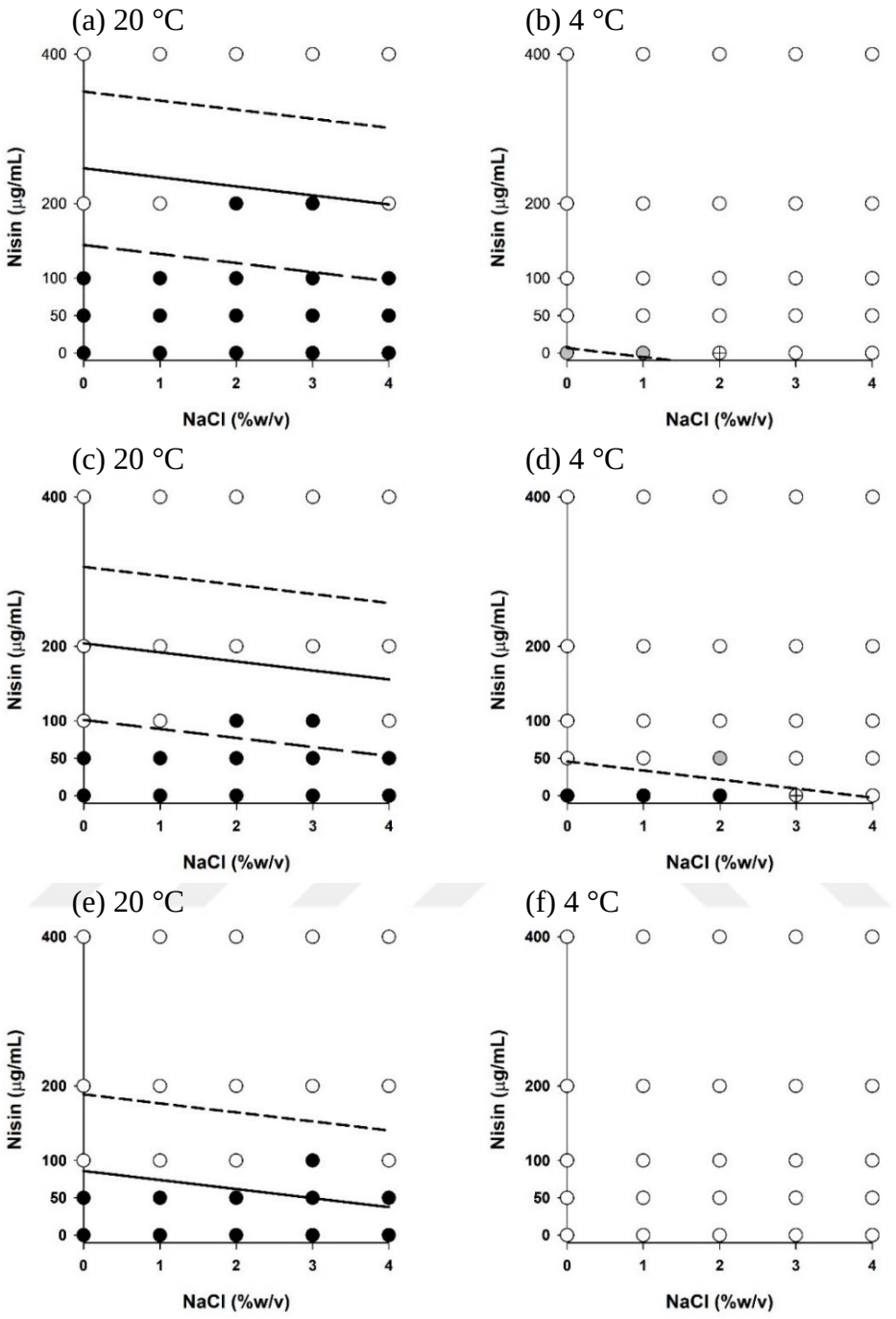
Model	Parametre	Tahmin	Standart Hata	P değeri
BASİT MODEL	Sabit	–7,020	1,011	<0,001
	T	0,459	0,0399	<0,001
	NaCl	–0,296	0,119	0,013
	nisin	–0,0214	0,00218	<0,001
	suş	1,044	0,18	<0,001
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	249,999		
	HL	13,469 (P = 0,097)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,883		
	Uyumlu Yüzde	93,30%		
KOMPLEKS MODEL	Sabit	–6,640	1,03	<0,001
	T	0,472	0,041	<0,001
	NaCl	–0,664	0,179	<0,001
	nisin	–0,027	0,003	<0,001
	suş	1,091	0,186	<0,001
	T × NaCl	—	—	—
	T × nisin	—	—	—
	T × suş	—	—	—
	NaCl × nisin	0,0026	0,0009	0,004
	NaCl × suş	—	—	—
	nisin × suş	—	—	—
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	240,896		
	HL	13,258 (P = 0,103)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,888		
	Uyumlu Yüzde	93,40%		

Çizelge 4.5 *L. monocytogenes* 137-3P suşu için bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, NaCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler

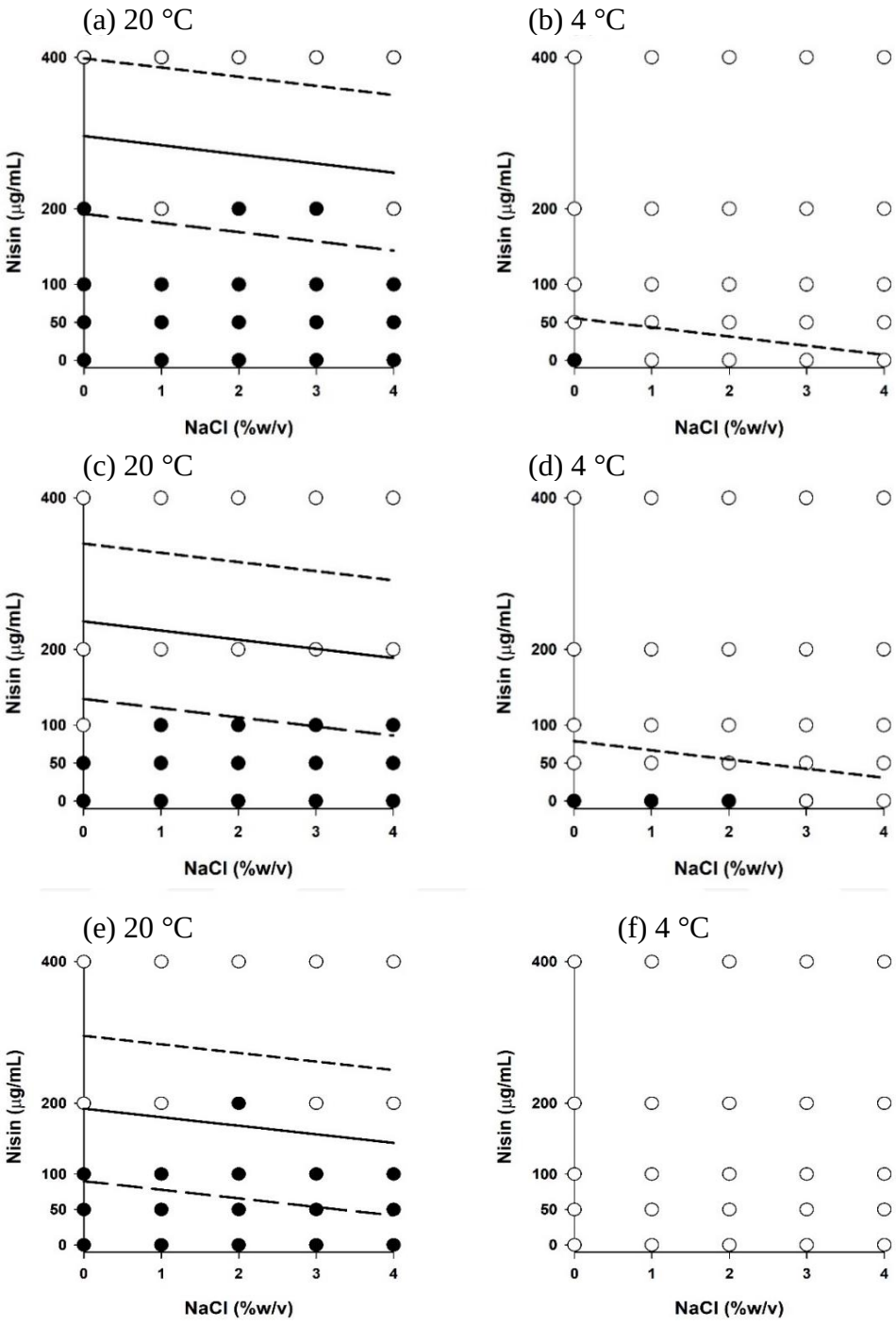
Model	Parametre	Tahmin	Standart Hata	P değeri
BASİT MODEL	Sabit	–4,753	0,704	<0,001
	T	0,349	0,0294	<0,001
	NaCl	–0,0812	0,0952	**0,349**
	nisin	–0,0248	0,00249	<0,001
	suş	0,712	0,131	<0,001
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	354,794		
	HL	20,047 (P = 0,010)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,831		
	Uyumlu Yüzde	91,60%		
KOMPLEKS MODEL	Sabit	–4,118	0,73	<0,001
	T	0,303	0,032	<0,001
	NaCl	–0,505	0,162	0,002
	nisin	–0,025	0,003	<0,001
	suş	0,74	0,134	<0,001
	T × NaCl	0,027	0,008	0,001
	T × nisin	—	—	—
	T × suş	—	—	—
	NaCl × nisin	—	—	—
	NaCl × suş	—	—	—
	nisin × suş	—	—	—
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	343,180		
	HL	12,397 (P = 0,134)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,837		
	Uyumlu Yüzde	91,10%		

Çizelge 4.6 *L. monocytogenes* ATCC 7644 için bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, NaCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler

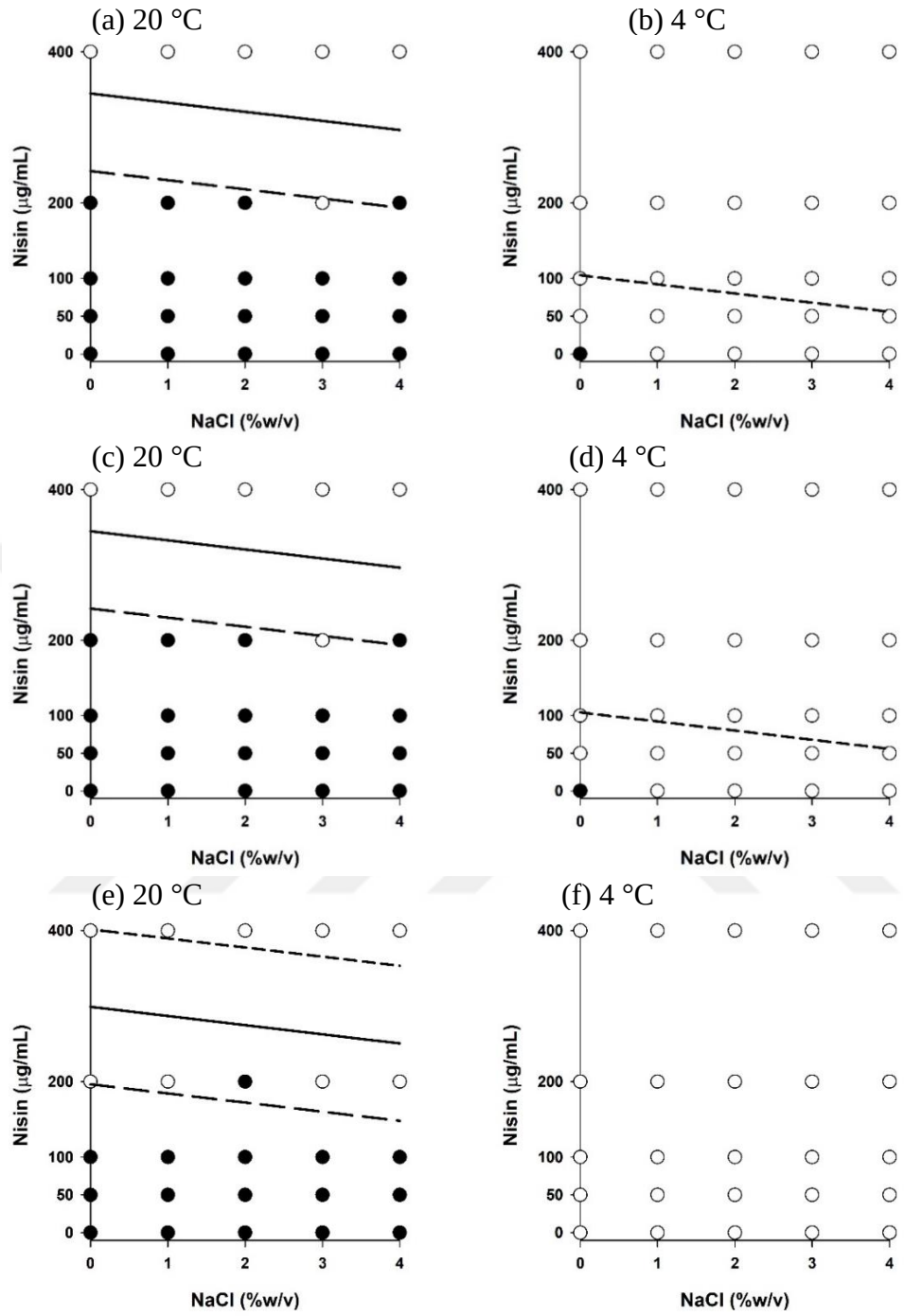
Model	Parametre	Tahmin	Standart Hata	P değeri
BASİT MODEL	Sabit	–17,377	2,188	<0,001
	T	0,619	0,0647	<0,001
	NaCl	0,0729	0,135	**0,59**
	nisin	–0,0256	0,00306	<0,001
	suş	2,279	0,334	<0,001
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	184,703		
	HL	16,744 (P = 0,033)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,923		
	Uyumlu Yüzde	96,10%		
KOMPLEKS MODEL	Sabit	–49,60	8,40	<0,001
	T	2,894	0,514	<0,001
	NaCl	–0,824	0,296	0,005
	nisin	–0,152	0,028	<0,001
	suş	7,97	1,412	<0,001
	T × NaCl	—	—	—
	T × nisin	—	—	—
	T × suş	–0,390	0,083	<0,001
	NaCl × nisin	0,0064	0,0019	<0,001
	NaCl × suş	—	—	—
	nisin × suş	0,02	0,004	<0,001
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	123,178		
	HL	2,424 (P = 0,965)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,950		
	Uyumlu Yüzde	97,60%		



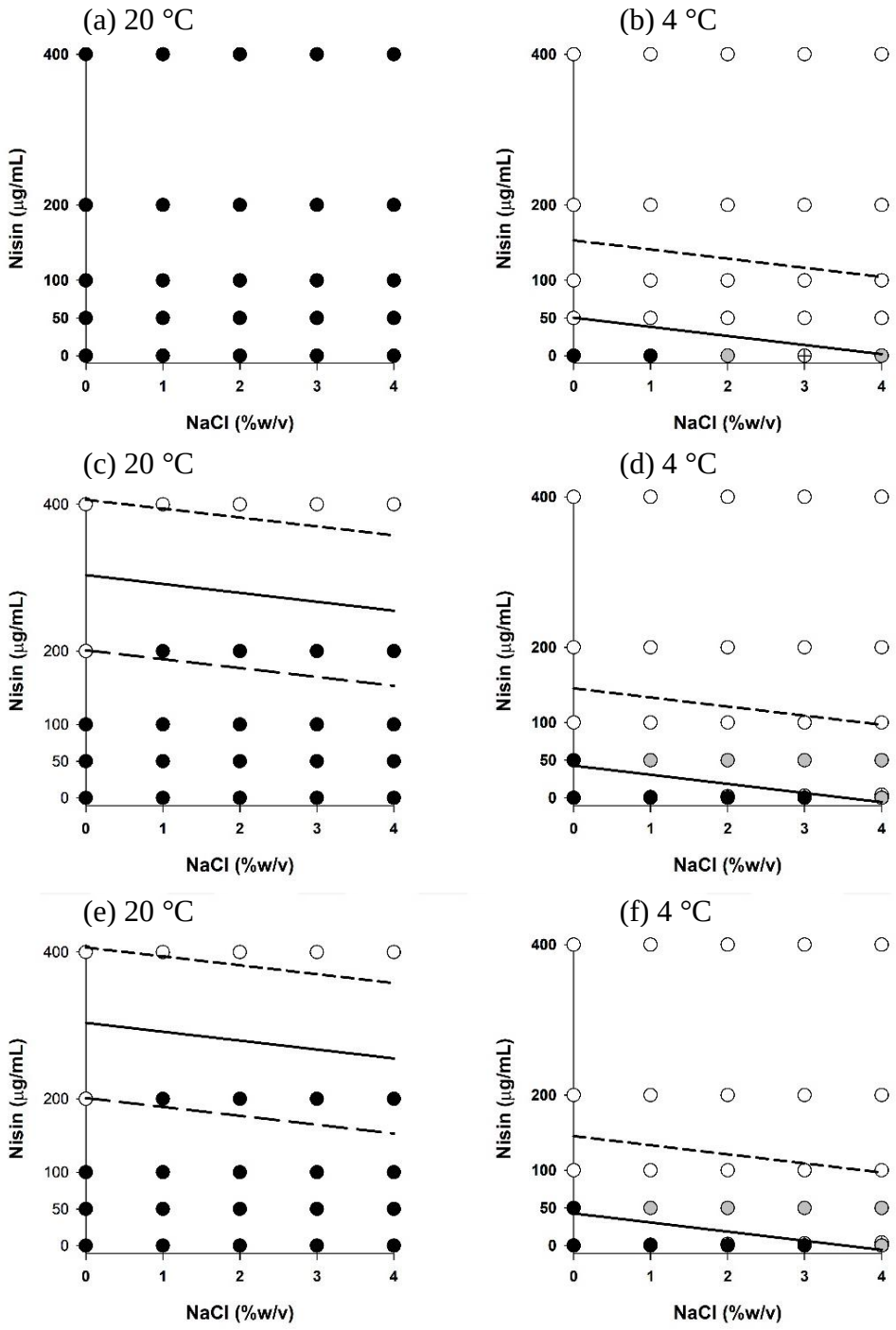
Şekil 4.9 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^3 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri (Beyaz daireler: üç tekerrürde de gelişmeme, siyah daireler: üç tekerrürde de gelişme, gri daireler: iki gelişme-bir gelişmeme ve çapraz daire: bir gelişme-iki gelişmeme gözlemleridir. Kısa kesikli çizgi, düz çizgi ve uzun kesikli çizgi Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (2)'ye göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarını temsil eder.)



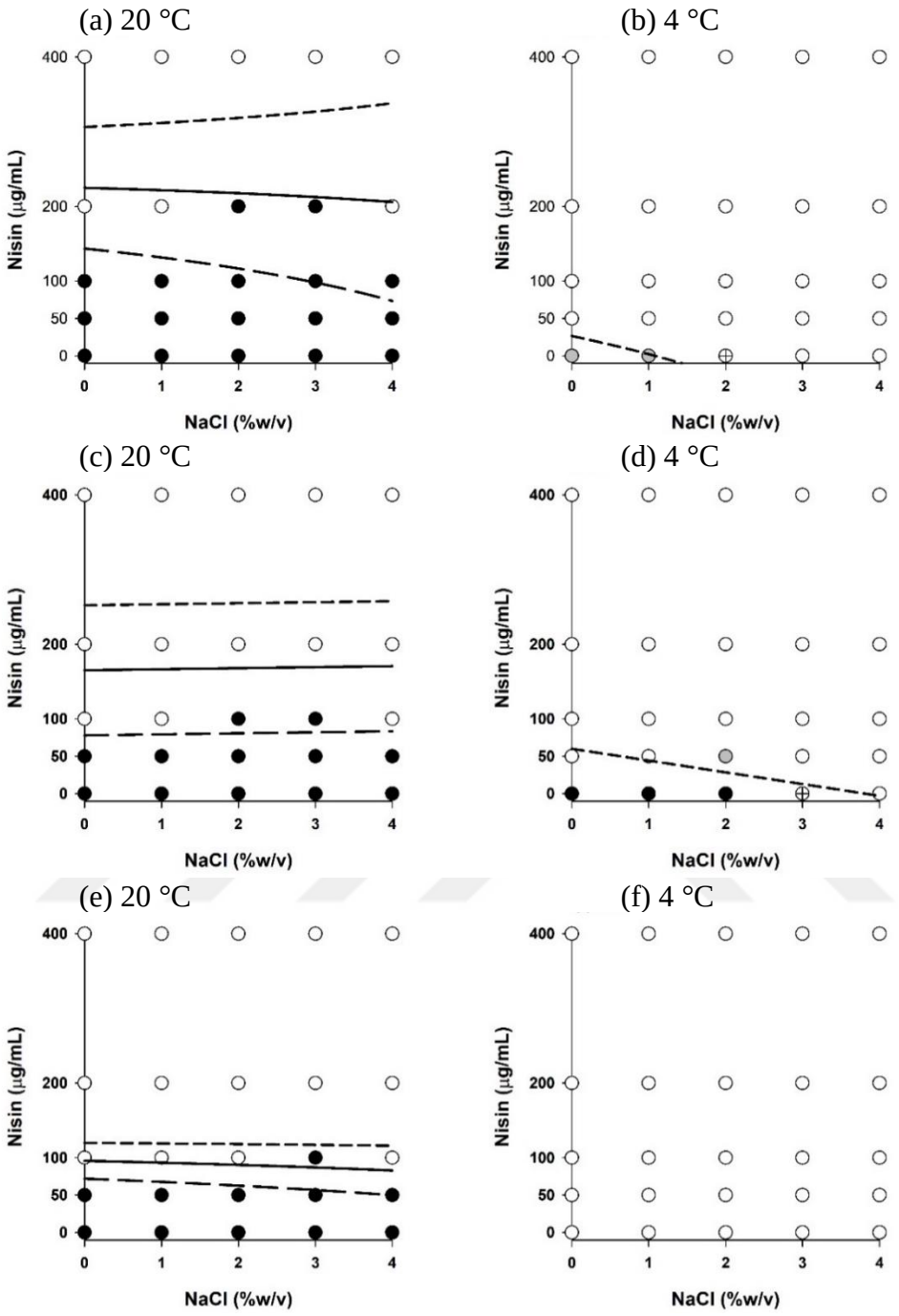
Şekil 4.10 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^4 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri (Beyaz daireler: üç tekerrürde de gelişmeme, siyah daireler: üç tekerrürde de gelişme, gri daireler: iki gelişme-bir gelişmeme ve çapraz daire: bir gelişme-iki gelişmeme gözlemleridir. Kısa kesikli çizgi, düz çizgi ve uzun kesikli çizgi Çizelge 4.4-4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (2)'ye göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarını temsil eder.)



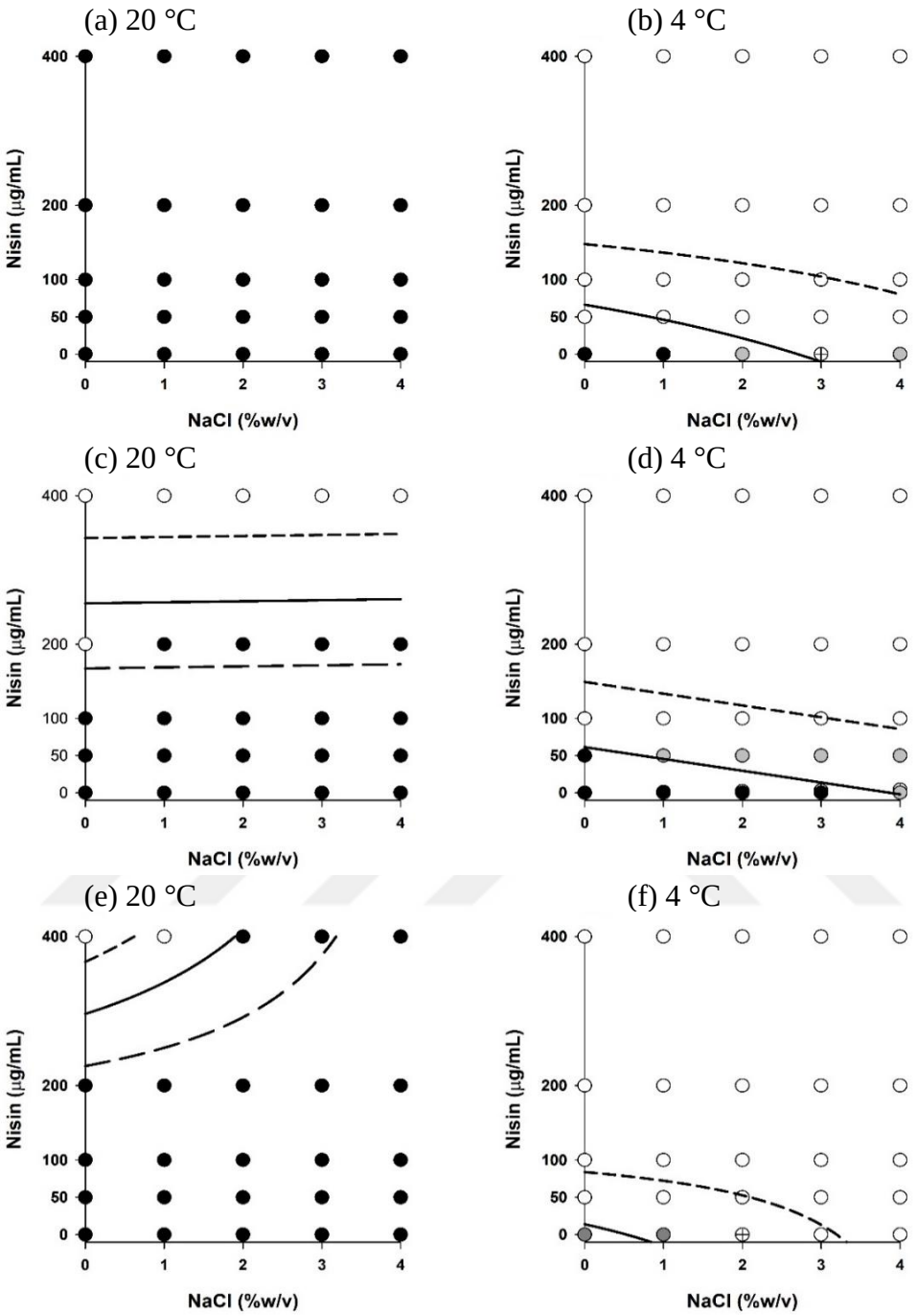
Şekil 4.11 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^5 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri (Beyaz daireler: üç tekerrürde de gelişmeme, siyah daireler: üç tekerrürde de gelişme, gri daireler: iki gelişme-bir gelişmeme ve çapraz daire: bir gelişme-iki gelişmeme gözlemleridir. Kısa kesikli çizgi, düz çizgi ve uzun kesikli çizgi Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (2)'ye göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarını temsil eder.)



Şekil 4.12 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^6 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri (Beyaz daireler: üç tekerrürde de gelişmeme, siyah daireler: üç tekerrürde de gelişme, gri daireler: iki gelişme-bir gelişmeme ve çapraz daire: bir gelişme-iki gelişmeme gözlemleridir. Kısa kesikli çizgi, düz çizgi ve uzun kesikli çizgi Çizelge 4.4-4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (2)'ye göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarını temsil eder.)



Şekil 4.13 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^3 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri (Beyaz daireler: üç tekerrürde de gelişmeme, siyah daireler: üç tekerrürde de gelişme, gri daireler: iki gelişme-bir gelişmeme ve çapraz daire: bir gelişme-iki gelişmeme gözlemleridir. Kısa kesikli çizgi, düz çizgi ve uzun kesikli çizgi Çizelge 4.4-4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (3)'e göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarını temsil eder.)



Şekil 4.14 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* (10^6 KOB/mL) suşlarının (a ve b: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, c ve d: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, e ve f: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) gelişme/gelişmeme arayüzleri (Beyaz daireler: üç tekerrürde de gelişmeme, siyah daireler: üç tekerrürde de gelişme, gri daireler: iki gelişme-bir gelişmeme ve çapraz daire: bir gelişme-iki gelişmeme gözlemleridir. Kısa kesikli çizgi, düz çizgi ve uzun kesikli çizgi Çizelge 4.4-4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (3)'e göre sırasıyla 0,1-0,5 ve 0,9'luk gelişme olasılıklarını temsil eder.)

Sıcaklığın *L. monocytogenes*'in gelişmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir: 37 °C'de, yüksek NaCl ve nisin konsantrasyonu kullanımı, en düşük inokülümde (10^3 KOB/mL) bile gelişmeyi önlemek için yeterli olmamıştır. Öte yandan, yüksek nisin konsantrasyonu (≥200 µg/mL), genel olarak tüm suşlar için ilk inokülüm 10^6 KOB/mL'den az olduğunda tuzun varlığında veya yokluğunda 20 °C'de çok etkili olmuştur. Düşük sıcaklık (4 °C), sonuçları büyük ölçüde değiştirmiş olup; en düşük nisin (50 µg/mL) konsantrasyonunda bile *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P suşları için gelişme gözlenmemiştir (Şekil 4.13b ve Şekil 4.13d). Ayrıca nisin ve tuz içermeyen koşullarda bile *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu için 8 haftalık depolama boyunca gelişme gözlenmemiştir (Şekil 4.13f).

Basit model sadece beş katsayıya sahipken (ana etkilerden bir tanesi önemsiz bulunmuştur), karmaşık model önemsiz terimlerin kaldırılmasından ve regresyonun tekrarlanmasından sonra *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P suşları için altı katsayıya ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu için 8 katsayıya sahip olmuştur (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Bu nedenle, basit modele göre kompleks model tercih edilmiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için P≤0,05 olan basit modelin HL istatistikleri zayıf bulunmuştur ve P değeri 0,05'in altında olduğundan model reddedilmiştir. Kompleks model için uyum değerlerinin %91'den ve maksimum yeniden ölçeklendirilmiş R^2 değerlerinin 0,83'ten büyük olması Denklem (3)'ün tahmin gücünün iyi olduğunu göstermiştir. Gelişme/gelişmeme sınırları genel olarak deneysel verilerle tutarlı bulunmuştur (Şekil 4.13, Şekil 4.14) ve deneysel aralık içindeki herhangi bir sıcaklık, tuz ve nisin seviyeleri kombinasyonu için Denklem (3) kullanarak *Listeria* suşlarının gelişme olasılığını tahmin etmek mümkün görülmüştür.

Üç *L. monocytogenes* suşunun gelişme yanıtı verileri (1: gelişme, 0: gelişme yok) 8 hafta boyunca farklı sıcaklık, tuz, nisin ve inokülüm konsantrasyonlarında incelenmiştir. Bu süre boyunca, sıvı ortamın hazırlanması sırasında kontaminasyon meydana gelmediğini gösteren negatif kontrollerin OD değerlerinde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Öte yandan, pozitif kontrolün (tuz ve nisin olmadan) OD değerleri beklendiği gibi her sıcaklık derecesinde artmıştır. Gelişme/gelişmeme sonuçları ayrıca nisinin gelişmeyi önlemek

için NaCl'den daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, tuzun nisin aktivitesi üzerinde koruyucu etkisi de gözlenmiştir. Örneğin, 20 ° C'de % 2 ve % 3 tuz konsantrasyonları ve 200 µg/mL nisin ile *L. monocytogenes* 120-3P suşu için gelişme gözlenmiş, ancak aynı sıcaklık ve nisin konsantrasyonu ile % 0, % 1 ve % 4 tuz konsantrasyonlarında gelişme gözlenmemiştir (Şekil 4.13a). *L. monocytogenes*'e karşı tuzun nisin aktivitesi üzerindeki koruyucu etkisi farklı çalışmalarda da gözlemlenmiştir. Ancak literatürde bu konuda çelişkili sonuçlara da rastlanmıştır. Benzer nitelikteki bazı çalışmalarda NaCl varlığının nisinin *L. monocytogenes*'e karşı koruyucu etkisini artırabileceği gösterilirken, bazılarında tuzun nisinin inhibitör etkisini azalttığı bildirilmiştir. Tuz ve nisin kombinasyonunun etkinliğine ilişkin önceki çalışmalardan elde edilen çelişkili sonuçlar, suşa veya türe bağlı olabileceği düşünülmektedir (Bouttefroy vd. 2000, Boziaris vd. 2007, Yamaki vd. 2015, Khanipour vd. 2016a).

Şekil 4.13 ile Şekil 4.14'ün karşılaştırılması başlangıç inokülüm seviyesinin de önemli bir parametre olduğunu göstermiştir. İlk inokülüm yoğunluğu arttıkça gelişme olasılığı da artmıştır ve bu sonuç Koutsoumanis ve Sofos tarafından, 2005 yılında yapılan çalışmayla uyumlu bulunmuştur. Gıdalardaki patojen kontaminasyon seviyeleri genellikle düşük olduğundan, düşük inokülüm seviyesine dayalı bir modelin kullanılması gerçek koşullara daha uygun olmaktadır. Ancak, düşük gelişme olasılığı için, daha yüksek inokülüm seviyeleri dikkate alınarak modelin belirlenmesi daha koruyucu olacaktır. Ayrıca, sıcaklık, NaCl ve nisin kullanılarak gelişmenin baskılanması, RTE-izolatları suşlarında (*L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P) *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşundan daha zor olmuştur (Şekil 4.13, Şekil 4.14).

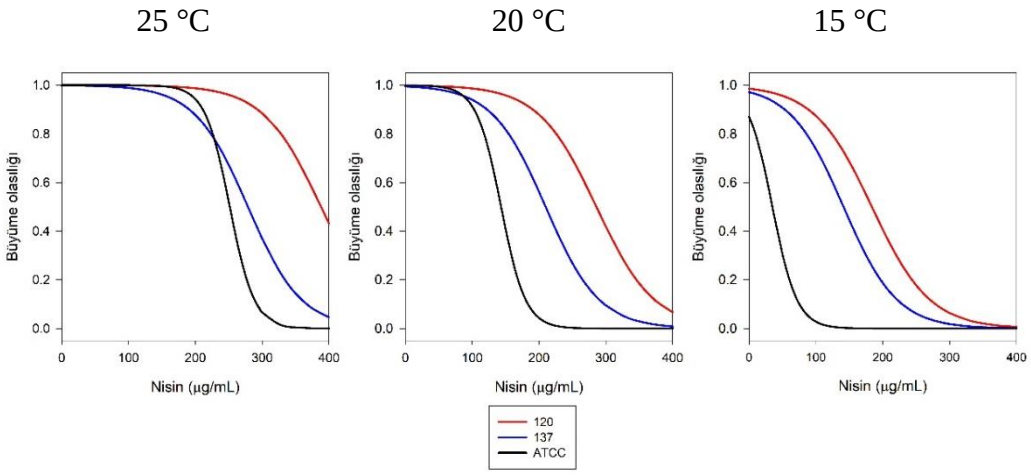
20 °C'de düşük nisin konsantrasyonlarında, en düşük başlangıç hücre yoğunluğunda (10^3 KOB/mL) bile, tüm suşlarda üç tekerrürde de gelişme görülmüştür (Şekil 4.13). *L. monocytogenes* 120-3P suşu 200 µg/mL nisin konsantrasyonunda %50 gelişme olasılığı gösterirken, ~150 µg/mL nisin konsantrasyonunda %90 gelişme olasılığı göstermiştir (Şekil 4.13a). *L. monocytogenes* 137-3P suşu ~75 µg/mL nisin konsantrasyonunda %90 gelişme olasılığı göstermiştir (Şekil 4.13c). *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ise 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda %50 gelişme olasılığı göstermiştir (Şekil 4.13e).

Genel olarak, üç tekerrür için de aynı tepki (gelişme veya gelişmeme) gözlenmiştir; ancak bazı istisnalar olmuştur. Örneğin, 4 °C'de, nisin ve NaCl olmadan, *L. monocytogenes* 120-3P suşu için üç tepkiden iki tanesi 1 (gelişme) ve bir tanesi 0 (gelişme yok) şeklinde olmuştur, yani gelişme olasılığı %67'dir (Şekil 4.13b). Nisin olmadan ve %3 NaCl ile 4 °C'de *L. monocytogenes* 137-3P suşu için, üç tepkiden bir tanesi 1 (gelişme) ve iki tanesi 0 (gelişme yok) şeklinde olmuştur, bu da gelişme olasılığının %33 olduğunu göstermektedir (Şekil 4.13d).

Tekerrürler arasındaki farklar Şekil 4.14b, Şekil 4.14d ve Şekil 4.14f'de de görülebilmektedir. 4 °C'de %2 NaCl varlığında *L. monocytogenes* 120-3P suşunun nisin olmadığında ve *L. monocytogenes* 137-3P suşunun ise 50 µg/mL nisin konsantrasyonunda tepkileri 2 gelişme ve 1 gelişmeme olarak gözlemlenmiş ve gelişme olasılıkları %67 olmuştur (Şekil 4.14b, Şekil 4.14d). 4 °C'de nisin olmadığı koşulda %2 NaCl varlığında *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun tepkisi ise 1 gelişme ve 2 gelişmeme şeklinde olmuş ve gelişme olasılığı %33 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14f).

20 °C'de genel olarak 100 µg/mL'nin altındaki nisin konsantrasyonlarında suşların tepkisi 3 tekerrürde de gelişme olarak görülmüştür (Şekil 4.9- 4.12). 4 °C'de düşük başlangıç inokülüm seviyelerinde (10^3 – 10^4 KOB/mL), tuz ve nisin konsantrasyonundan bağımsız olarak neredeyse tüm suşlarda 3 tekerrürde de gelişmeme gözlemlenmiştir (Şekil 4.9b, Şekil 4.9d, Şekil 4.9f). 4 °C'de *L. monocytogenes* 120-3P suşunun nisin olmadan %2 NaCl'de tepkisi 2 gelişme ve 1 gelişmeme olmuştur. *L. monocytogenes* 137-3P ise aynı tepkiyi ise 50 µg/mL nisin konsantrasyonunda %1-2-3-4 NaCl varlığında göstermiştir (Şekil 4.12b, Şekil 4.12d).

Sabit bir NaCl ve başlangıç suş konsantrasyonunda sıvı besiyerinde 8 hafta sonundaki gelişme olasılıklarını göstermek amacıyla yapılan ve Şekil 4.15'te verilen simülasyonlarda genel olarak sıcaklık düştükçe suşların gelişme olasılığının da azaldığı ayrıca aynı sıcaklık ve nisin konsantrasyonunda gelişme olasılığının en yüksek *L. monocytogenes* 120-3P suşunda en düşük ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda olduğu görülmüştür.



Şekil 4.15 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) farklı sıcaklık ve nisin konsantrasyonlarında (%1,5 NaCl konsantrasyonunda ve $10^{4,4}$ KOB/mL suş yoğunluğunda) gelişme olasılıkları (Simülasyonlar, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilen katsayı değerleri ile Denklem (3)'e göre çizilmiştir.)

Şekil 4.15'te gösterilen simülasyonlara göre 25 °C'de 200 µg/mL'nin altındaki nisin konsantrasyonlarında üç suş da %90'ın üstünde gelişme olasılığı sergilemiştir. 20 °C'de ise 100 µg/mL'nin altında tüm suşlarda %100'e yakın gelişme olasılığı görülmüştür. 15 °C'de 300 µg/mL'nin üzerindeki nisin konsantrasyonlarında ise tüm suşlarda gelişme olasılığının bulunmadığı görülmüştür. Nisin konsantrasyonunun azalmasıyla ve sıcaklığın artmasıyla tüm suşların gelişme olasılığı artmıştır. 300 µg/mL nisin varlığında *L. monocytogenes* 120-3P suşunun gelişme olasılığı 25 °C'de %90 iken 20 °C'de %40'lara kadar düşmüştür. 250 µg/mL nisin konsantrasyonunda 25 °C'de %90'ın üstünde, 20 °C'de %70 ve 15 °C'de yaklaşık %20 gelişme olasılığı gösteren *L. monocytogenes* 120-3P suşunun, 150 µg/mL nisin konsantrasyonunda gelişme olasılığı 20 °C'de %95 ve 15 °C'de %70 olarak tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* 137-3P suşunun 200 µg/mL nisin konsantrasyonunda 25 °C'de %90 olan gelişme olasılığı 15 °C'de %20'lere kadar düşmüştür. Nisin konsantrasyonu 300 µg/mL olduğunda ise *L. monocytogenes* 137-3P suşu 25 °C'de %35 gelişme olasılığı göstermiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ise 200 µg/mL nisin konsantrasyonunda 25 °C'de %95 gelişme olasılığına sahipken 20 °C'de %10'un altında gelişme olasılığı göstermiştir. 20 °C'de 150 µg/mL nisin varlığında ise gelişme olasılığı %40 olarak tespit edilmiştir. 25 °C'de ise 250 µg/mL nisin konsantrasyonunda gelişme olasılığı %60 iken, nisin

konsantrasyonu 300 µg/mL olduğunda gelişme olasılığı %10'a düşmüştür. *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı sıcaklık düşüşünden diğer suşlara göre daha fazla etkilenmiştir. 20 °C'de 200 µg/mL'nin üstündeki nisin konsantrasyonlarında ve 15 °C'de 100 µg/mL'nin üstündeki nisin konsantrasyonlarında *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda gelişme olasılığı gözlenmemiştir.

4.4 Sıcaklık, KCl, Nisin ve Suş Tipinin Sıvı Besiyerinde *Listeria monocytogenes*'in Gelişmesi Üzerindeki Etkileri

Sıcaklık, nisin, NaCl, başlangıç konsantrasyonu ile yapılan ve yukarıda gösterilen modellerden anlaşıldığı üzere suşların başlangıç konsantrasyonu artıkça gelişme olasılığı da artmaktadır. Dolayısıyla yeni çalışmada en yüksek konsantrasyon (10^6 KOB/mL) kullanılmıştır. Dahası suşlar arasında da gelişme olasılıkları arasında farklar gözlemlenmiştir: *L. monocytogenes* 120-3P suşu nisin ve NaCl konsantrasyonlarından fazla etkilenmezken (gelişme olasılığı yüksek) *L. monocytogenes* ATCC suşu kolayca etkilenebilmektedir (gelişme olasılığı düşük). Bu nedenle yeni çalışmada suş da bir değişken olarak modele eklenmiştir.

Tüm değişkenlerin yer aldığı en basit model (ana etkilere sahip model) ve daha kompleks modellerin katsayı tahminleri, bunların standart hataları ve P değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Yalnızca ana etkilere sahip basit model için KCl teriminin anlamsız ($P>0,05$) katsayıya sahip olduğu görülmüştür. Karmaşık model birçok denemeden sonra elde edilmiş ve ikili-üçlü interaksiyonların yer aldığı modeldir.

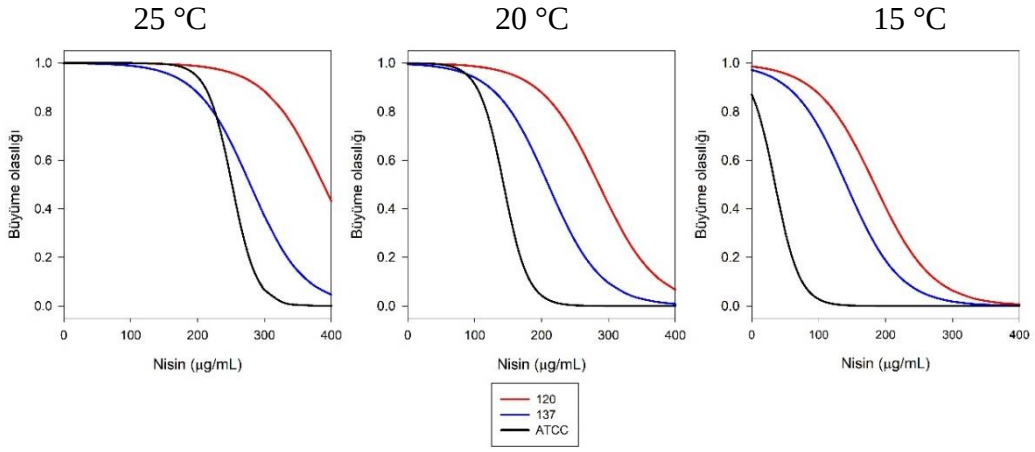
Çizelge 4.7 Bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, KCl ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler

Model	Parametre	Tahmin	Standart Hata	P değeri
BASİT MODEL	Sabit	1,18	0,46	0,01
	T	0,22	0,019	<0,001
	nisin	− 0,025	0,002	<0,001
	KCl	− 0,078	0,099	**0,431**
	suş	− 1,11	0,19	<0,001
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	333,970		
	HL	16,084 (**P = 0,041**)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,786		
	Uyumlu Yüzde	87,9%		
KOMPLEKS MODEL	Sabit	− 5,88	1,50	<0,001
	T	1,34	0,43	0,0017
	nisin	− 0,15	0,04	<0,001
	T × nisin	0,0059	0,001	<0,001
	T × KCl	− 0,14	0,045	0,0025
	T × suş	0,22	0,048	<0,001
	T × nisin × suş	− 0,005	0,001	<0,001
	nisin × KCl × suş	0,012	0,004	0,0026
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	94,047		
	HL	0,216 (P = 1,000)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,950		
	Uyumlu Yüzde	96,6%		

Basit model sadece beş katsayıya sahipken (önemsiz bir ana etki ile), karmaşık model önemsiz terimlerin kaldırılmasından ve regresyonun tekrarlanmasından sonra 8 katsayıya sahiptir (Çizelge 4.7). P<0,05 olan basit modelin HL istatistikleri zayıf bulunmuştur ve P

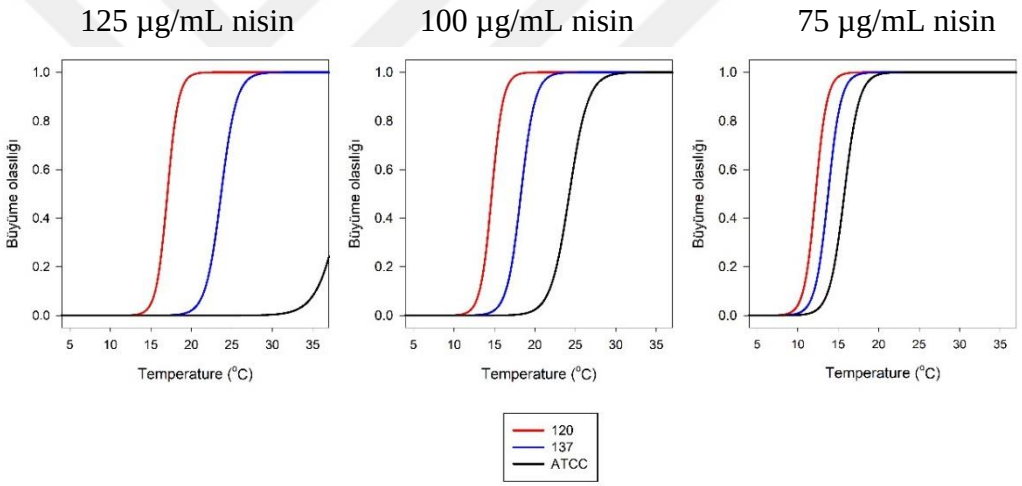
değeri 0,05'in altında olduğundan basit model reddedilir. Kompleks model için uyum değeri %96 ve maksimum yeniden ölçeklendirilmiş R^2 değeri 0,95 ile yüksek uyumluluk göstermiştir. HL değerinin düşük ve buna karşılık P değerinin yüksek olması modelin verilere iyi uyum sağladığını göstermektedir. Buna göre Denklem (3) kullanılarak *L. monocytogenes* suşlarının farklı nisin, KCl ve sıcaklık parametrelerinde gelişme olasılığı tahmin edilebilir.

Şekil 4.16'daki simülasyonlara göre 25 °C'de 100 µg/mL'nin altındaki nisin konsantrasyonlarında üç suş için gelişme olasılığı %100 olarak görülmüştür. 200 µg/mL nisin konsantrasyonunda *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı 25 °C'de %100 iken 20 °C'de %10'lara düşmüştür. 150 µg/mL nisin konsantrasyonunda *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme olasılığı 20 °C'de %80 iken, 15 °C'de %50'ye kadar düşmüştür. 120-3P suşunun 20 °C'de 200 µg/mL nisin konsantrasyonunda %90 olan gelişme olasılığı 15 °C'de %40'lara düşmüştür. 20 °C'de 200 µg/mL'nin, 15 °C'de ise 100 µg/mL'nin üzerindeki nisin konsantrasyonlarında *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı görülmemiştir.



Şekil 4.16 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı sıcaklıkta nisin konsantrasyonuna göre (%1,5 KCl konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları (Simülasyonlar, Çizelge 4.7'de verilen kompleks modelin katsayı değerlerine göre çizilmiştir.)

Şekil 4.17'de verilen simülasyonlara göre, üç suş için %100 gelişme olasılığı 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda 30 °C'nin üzerinde görülürken, 75 µg/mL nisin konsantrasyonunda 20°C'nin üzerinde görülmüştür. 125 µg/mL nisin konsantrasyonunda *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P suşları 30°C'nin üzerinde %100 gelişme olasılığı göstermiştir. 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda 15 °C'de *L. monocytogenes* 120-3P suşunun gelişme olasılığı %60 iken, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı 25 °C'de %60 bulunmuştur. *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme olasılığı 25 °C'de 125 µg/mL nisin konsantrasyonunda %75, 20 °C'de 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda %90 olmuştur. 75 µg/mL nisin konsantrasyonunda 15 °C'de *L. monocytogenes* 137-3P suşu %80 gelişme olasılığı gösterirken, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı %30 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı nisin konsantrasyonunda sıcaklığa göre (%1,5 KCl konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları (Simülasyonlar, Çizelge 4.7'de verilen kompleks modelin katsayı değerlerine göre çizilmiştir.)

Sabit bir KCl ve başlangıç suş konsantrasyonunda sıvı besiyerinde 8 hafta sonundaki gelişme olasılıklarını göstermek amacıyla yapılan simülasyonlar Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Bu simülasyonlara göre nisin konsantrasyonu arttıkça suşlar arası farkında arttığı görülürken, en yüksek gelişme olasılığı yine *L. monocytogenes* 120-3P suşunda, en düşük gelişme olasılığı ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda

görülmüştür. Sıcaklık yükseldikçe tüm suşların gelişme olasılığının arttığı, nisin konsantrasyonu yükseldiğinde ise tüm suşların gelişme olasılığının azaldığı görülmüştür. Mevcut sonuçlar NaCl ile yapılan sonuçlarla benzerlik göstermiştir.

4.5 Sıcaklık, $C_6H_7KO_2$, Nisin ve Suş Tipinin Sıvı Besiyerinde *Listeria monocytogenes*'in Gelişmesi Üzerindeki Etkileri

Aynı şekilde basit ve kompleks modellerin katsayı tahminleri, bunların standart hataları ve P değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Yalnızca ana etkilere sahip basit model için sabit terim ve potasyum sorbat terimlerinin anlamsız ($P>0,05$) olduğu görülmüştür.

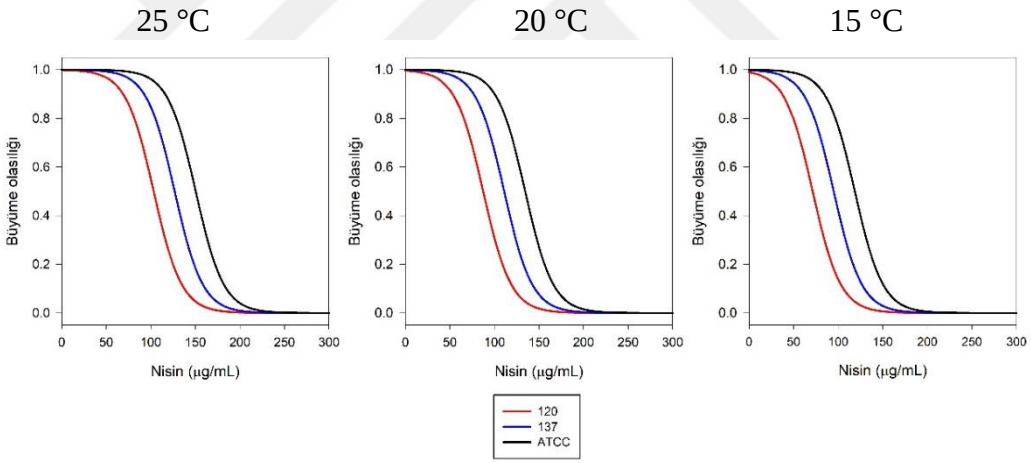
Basit model sadece beş katsayıya sahipken (önemsiz bir ana etki ile), karmaşık model önemsiz terimlerin kaldırılmasından ve regresyonun tekrarlanmasından sonra 6 katsayıya sahiptir (Çizelge 4.8). Kompleks model için uyum değerinin %92 ve maksimum yeniden ölçeklendirilmiş R^2 değerinin 0,87 olması modelin tahmin gücünün yüksek olduğu anlamına gelir ve Denklem (3) *L. monocytogenes* suşlarının farklı nisin, sorbat ve sıcaklık parametrelerinde gelişme olasılığının tahmininde kullanılabilir.

Çizelge 4.8 Bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (T), nisin, sorbat ve suş için model parametreleri ve bağıl istatistikler

Model	Parametre	Tahmin	Standart Hata	P değeri
BASİT MODEL	Sabit	− 0,047	0,508	**0,926**
	T	0,17	0,021	<0,001
	nisin	− 0,056	0,005	<0,001
	sorbat	− 0,033	0,031	**0,298**
	suş	1,46	0,254	<0,001
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	224,897		
	HL	9,148 (P = 0,330)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,868		
	Uyumlu Yüzde	92,1%		
KOMPLEKS MODEL	T	0,204	0,026	<0,001
	nisin	− 0,064	0,007	<0,001
	suş	1,55	0,23	<0,001
	sorbat × suş	− 0,069	0,027	0,0103
	nisin × sorbat × suş	0,0011	0,00029	<0,001
	T × nisin × sorbat × suş	− 0,00003	0,00001	0,0015
	Uyum İyiliği			
	-2lnL	213,896		
	HL	12,097 (P = 0,147)		
	Maks. yeniden ölçeklendirilmiş R^2	0,876		
	Uyumlu Yüzde	92,6%		

Nisin konsantrasyonu 50 µg/mL'nin altında iken Şekil 4.18'de simüle edilen 3 sıcaklık (15-20-25 °C) değerinde 3 suşunda gelişme olasılığı %100'e yakın olarak görülmüştür. Nisin konsantrasyonu 100 µg/mL olduğunda 25 °C'de %95 olan *L. monocytogenes*

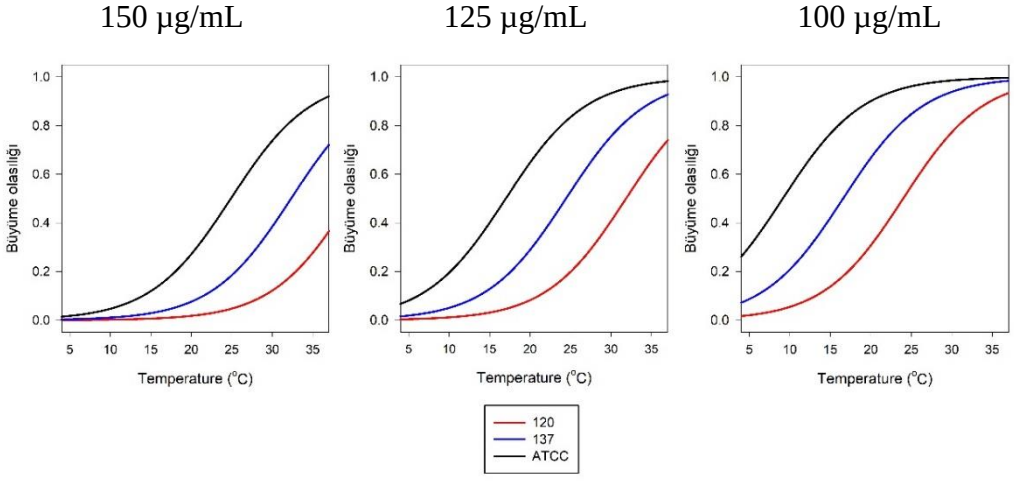
ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı 15 °C'de %80'lere düşmüştür. 150 µg/mL nisin varlığında ise olan *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı 25 °C'de %50'nin üzerindeyken 15 °C'de %10'lara kadar düşmüştür. *L. monocytogenes* 137-3P suşu 25 °C'de 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda %80'nin üzerinde gelişme olasılığına sahipken 150 µg/mL nisin konsantrasyonunda ~%20 gelişme olasılığı göstermiştir. 15 °C'de 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda gelişme olasılığı ise %50 olarak görülmüştür. *L. monocytogenes* 120-3P suşunun 25 °C'de 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda %50 olan gelişme olasılığı 150 µg/mL nisin konsantrasyonunda %10'un altına düşmüştür. Nisin konsantrasyonunun artması üç suşun da gelişme olasılığını önemli ölçüde düşürmüştür. 20 °C'de nisin konsantrasyonu 100 µg/mL'den 150 µg/mL'ye çıktığında *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme olasılığı %60'lardan %10'lara, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı %90'dan %30'lara kadar düşmüştür.



Şekil 4.18 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı sıcaklıkta nisin konsantrasyonuna göre (%0,125 potasyum sorbat konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları (Simülasyonlar, Çizelge 4.8'de verilen kompleks modelin katsayı değerlerine göre çizilmiştir.)

%0,125 potasyum sorbat ve 125 µg/mL nisin içeren sıvı besiyerinde 20 °C'de 8 hafta inkübasyon sonucunda *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı yaklaşık olarak %65 iken, *L. monocytogenes* 137-3P suşunun yaklaşık %30 bulunmuştur. Nisin

konsantrasyonu 20 °C'de 100 µg/mL'ye düşürüldüğünde ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişme olasılığı %90 olasılıklara çıkarken *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme olasılığı ~%70, *L. monocytogenes* 120-3P suşunun gelişme olasılığı ise ~%30 olmuştur. 30 °C'deki inkübasyon ile gelişme olasılıklarının arttığı ve 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda *L. monocytogenes* 120-3P suşu için %75'in, *L. monocytogenes* 137-3P suşu için %90'ın ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu için %95'in üzerine çıktığı görülmüştür. Sıcaklık 10 °C'ye düştüğünde ise 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda ~%60 gelişme olasılığı olan *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 125 µg/mL nisin konsantrasyonunda %20 gelişme olasılığına sahip olduğu görülmüştür. 10 °C'de 100 µg/mL nisin konsantrasyonunda *L. monocytogenes* 120-3P suşunun gelişme olasılığı %10'un altına düşerken *L. monocytogenes* 137-3P suşunun gelişme olasılığı %20 olarak görülmektedir. 150 µg/mL nisin konsantrasyonunda ise gelişme olasılıkları düşerek, optimum gelişmenin görüldüğü 30 °C'de *L. monocytogenes* ATCC 7644 için %75, *L. monocytogenes* 137-3P suşu için %40 ve *L. monocytogenes* 120-3P suşu için %10 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.19'da gösterilen bu sonuçlara göre sıcaklık ve nisin konsantrasyonunun *L. monocytogenes* suşlarının gelişme olasılığı üzerinde önemli etkilere sahip olduğu anlaşılabilmektedir.



Şekil 4.19 Sıvı besiyerinde 8 hafta sonunda *L. monocytogenes* suşlarının (kırmızı çizgi: *L. monocytogenes* 120-3P suşu, mavi çizgi: *L. monocytogenes* 137-3P suşu, siyah çizgi: *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu) 3 farklı nisin konsantrasyonunda sıcaklığa göre (%0,125 potasyum sorbat konsantrasyonunda) gelişme olasılıkları (Simülasyonlar, Çizelge 4.8'de verilen kompleks modelin katsayı değerlerine göre çizilmiştir.)

Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilen sabit bir potasyum sorbat ve başlangıç suş konsantrasyonunda sıvı besiyerinde 8 hafta sonundaki gelişme olasılıkları simülasyonunda en yüksek gelişme olasılığı diğer tuzların (NaCl ve KCl) aksine *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda görülürken en düşük gelişme olasılığı da *L. monocytogenes* 120-3P suşunda görülmüştür. Ayrıca diğer tuzlarda görülen suşlar arası farkın sıcaklıkla artışı potasyum sorbat tuzunda görülmemiş ve suşlar arası fark potasyum sorbat kullanımında değişmemiştir. Sıcaklık yükseldikçe yine tüm suşların gelişme olasılığı artmıştır. Nisin konsantrasyonu azaldıkça tüm suşların gelişme olasılığı artmıştır.

4.6 Gıda Ortamında Modellerin Validasyon Çalışması

Sıvı besiyerinde yaptığımız çalışmaların gıda ortamında validasyonunu göstermek amacıyla UHT süt ve ev yapımı katkı maddesi içermeyen et suyu kullanılmıştır. %1,5 KCl veya %0,125 $C_6H_7KO_2$ ilaveli gıda ortamlarında 25 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL ve 250 µg/mL nisin konsantrasyonlarının gelişme üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak 3 *L. monocytogenes* suşunun (*L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644) 10^6 KOB/mL başlangıç suş yoğunluğunda 8 °C ve 12 °C sıcaklıklarda 2 aylık inkübasyon süresince gelişme/gelişmeme durumu belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.7 ve 4.8'de yer alan kompleks modellere yerleştirilip katsayılarla birlikte hesaplanmıştır. Böylece sıvı besiyerinde geliştirilen modellerin, gıda ortamında (UHT süt ve ev yapımı katkı maddesi içermeyen et suyu) tahmin (validasyon) çalışması gerçekleştirilmiştir.

Sütte yapılan çalışma sonucunda 48 denemenin 22 tanesinin sonuçları modelle uyumlu çıkarken, et suyu ile yapılan çalışmanın sonucunda ise 48 denemenin 35 tanesi modelle uyumlu çıkmıştır. Besiyerinde geliştirilmiş olan modelin tahmininin gıdalarda düşük olması beklenen bir sonuç olup, özellikle et suyunda görülen %70'in üzerindeki tahmin başarısı azımsanamayacak düzeydedir. Et suyunda daha başarılı sonuçlar alınmasının nedeni ise kullandığımız besiyeri ile et suyunun benzer özellikler taşımasından kaynaklanmış olabilir. Öte yandan, sütteki yağ, kalsiyum vb. bileşenler sütün kullanılan besiyerinden farklılaşmasına yol açarak tahmin oranının düşmesine neden olmuş olabilir.

Besiyerinde elde edilen sonuçların gerçek gıda ortamında farklı sonuç vermesi olası olduğundan tüm modelleme çalışmaları gıdalarda kullanılmadan önce, daha fazla sayıda gıda örneğinde denenmelidir.

Genellikle sıvı besiyeri kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarında gıdada olması beklenenden daha ağır koşullar altında gelişme incelenir. Gıdalarda pH, a_w, depolama sıcaklığından başka etkili ek faktörler olduğundan dolayı bu modellerin gıdalarda geliştirilmesi besiyerinde geliştirilenlere göre daha doğru sonuç verecektir (Bolton ve Frank 1999).

Genellikle gelişme /gelişmeme modelleri sıcaklık, pH ve su aktivitesi gibi temel çevresel faktörlerin etkisine odaklanmıştır. Ancak gıda yapısı, mikrobiyal etkileşimler, hücrelerin fizyolojik durumu, inokülüm boyutu dahil olmak üzere mikrobiyal gelişmeyi potansiyel olarak etkileyebilecek diğer faktörler genellikle göz ardı edilir. Koutsoumanis vd.'nin 2004 yılında yaptıkları çalışma ile substrat yapısının ve hücre immobilizasyonunun, mikrobiyal gelişme sınırlarını modellerken dikkate alınması gereken önemli faktörler olduğunu göstermiştir. Katı gıdalardaki mikrobiyal gelişme sınırlarını tahmin etmek için sıvı besiyerinde geliştirilen modellerin, doğru tahminler sağlayacağı bildirilmiştir.

Tahmine dayalı modeller genellikle laboratuvar ortamında elde edilen veriler üzerine kurulduğundan, bir modeli doğrulamanın en iyi bir yolu, tahminini gıda ürünleri için elde edilen verilerle karşılaştırmaktır (Pinon vd. 2004). Modelleme çalışmaları, gıda muhafazasında uygulanabilecek en uygun koşulların tanımlanmasında veya bir patojen riskini en aza indirmek için pratik formülasyon belirlenmesinde gıda endüstrileri için faydalı olabilir (Valero vd. 2006).

5. SONUÇ

L. monocytogenes suşlarına nisin, NaCl, KCl ve potasyum sorbatın farklı konsantrasyonlarının, farklı sıcaklık ve sürelerdeki depolama koşullarında oluşturduğu stres etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında elde edilen gelişme/gelişmeme verileri lojistik regresyon kullanılarak modellenmiştir. Elde edilen sonuçların çeşitli uyum iyiliği indekslerine göre değerlendirilmesiyle kabul edilebilir model performansı gözlemlenmiş olup, bu çalışmada geliştirilen modellerin *L. monocytogenes* gelişmesinin kontrolünde ve gelişme olasılıklarının belirlenmesinde faydalı olabileceği belirlenmiştir. Gıdalarda patojen suşların gelişmesini kontrol altına alabilecek muamelelerin belirlenerek, mikroorganizma-gıda ilişkisinin daha iyi anlaşılması ve daha güvenli gıda geliştirilmesine katkı sağlayacak hızlı tahminlerin bu modellerin uygulanmasıyla mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile elde ettiğimiz sonuçları şu şekilde özetleyebiliriz;

a. Mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri 29 adet *L. monocytogenes* ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için 128 ile 4096 µg/mL arasında tespit edilmiştir. En yüksek, orta ve en düşük MİK değerlerine sahip suşlar arasından dört *L. monocytogenes* suşu seçilmiştir. Seçilen suşlardan *L. monocytogenes* 120-3P nisine (4096 µg / mL) en dirençli suş iken, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* 241-1P suşları 512 µg / mL ile en düşük MİK değerlerini sergilemiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes* ATCC 7644 gözlemlenen 128 µg/mL'lik MİK değeriyle nisine karşı en hassas suş olmuştur.

b. *L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P, *L. monocytogenes* 151-1P, *L. monocytogenes* 241-1P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları için 2 $\log_{10}$ ve 7 $\log_{10}$ arasındaki başlangıç konsantrasyonlarında 37 °C'de inkübasyon süresince 600 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu ile yapılan ölçümlerle OD değerinin 0,15 olduğu zaman koloni sayımları tespit edilmiştir. Denklem 1'e göre OD değerinin 0,15 olduğu zamana (t_{OD}) karşılık bakterinin başlangıç konsantrasyonu ($\log_{10}N_0$) çizilmiş ve doğrusal regresyon kullanılarak her bir suş

için gelişme hızı hesaplanmıştır. En yüksek ve en düşük gelişme oranları sırasıyla *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 151-1P suşları için 2,21 ve 2,04 h^{-1} olarak elde edilmiştir. Hesaplanan gelişme hızlarına göre, gelişme hızının diğer suşlara göre daha iyi olduğu belirlenen *L. monocytogenes* 120-3P ve *L. monocytogenes* 137-3P suşları ile çalışmaya devam edilmiştir.

c. Tespit süresi (TTD) verilerinin gelişme hızlarını koloni sayımlarıyla karşılaştırmak için üç suş (*L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644) için koloni sayımı yöntemi de uygulanmıştır. Mikrobiyal gelişme eğrilerini tanımlamak için bu suşların gelişme verisine Gompertz, Baranyi ve ÜFD modelleri uygulanmıştır. Gelişme hızları her iki yöntemde de (TTD ve koloni sayımı) çok yakın bulunarak 3 suş için kontrol sağlanmıştır.

d. Tüm modeller $R^2_{ayarlı}$>0,97 ile makul uyumlar üretmiştir ve TTD deneylerine en yakın gelişme oranları, ÜFD modelin uyumundan elde edilmiştir. Bu model uyumuna göre, en yüksek gelişme hızı *L. monocytogenes* 137-3P suşu için 2,25 h^{-1}, ardından *L. monocytogenes* 120-3P suşu için 2,10 h^{-1} ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu için 2,04 h^{-1} olmuştur. MİK çalışmasından elde edilen bilgiler, gelişme hızı çalışmasıyla birleştirilmiş ve daha yüksek gelişme hızlarına sahip suşlar (*L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644), ayrıca gelişme/gelişmeme çalışması için kullanılmıştır.

e. Önerilen modeller [Denklem (2) ve (3)] mikroplaka okuyucu ile elde edilen gelişme/gelişmeme verilerine uygulanmıştır. %0, %1, %2, %3 ve %4 NaCl içeren sıvı besiyerinde farklı nisin konsantrasyonu ve sıcaklıklarda 2 ay sonunda belirlenen olası gelişme olasılığı (p= 0,9), eşit gelişme/gelişmeme olasılığı (p= 0,5) ve olası olmayan gelişme olasılığı (p= 0,1) arayüzleri çizilerek, basit model ve kompleks model parametreleri gösterilmiştir.

f. Sabit bir NaCl ve başlangıç suş konsantrasyonunda sıvı besiyerinde 8 hafta sonundaki gelişme olasılıklarını göstermek amacıyla yapılan simülasyonlarda genel olarak sıcaklık düştükçe suşların gelişme olasılığının da azaldığı ayrıca aynı sıcaklık ve nisin konsantrasyonunda gelişme olasılığının en yüksek *L. monocytogenes* 120-3P suşunda en düşük ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda olduğu görülmüştür.

g. Sıcaklık, NaCl, nisin ve inokülüm boyutunun farklı seviyeleri ile gelişme/gelişmeme çalışması, RTE-izole suşların gelişmesini önlemenin *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşundan daha zor olduğunu ortaya koymuştur. İnokülüm miktarı arttıkça gelişme olasılığı da artmıştır. Ayrıca nisin, *L. monocytogenes*'in gelişmesini baskılamada NaCl'den daha etkili olmuş ve NaCl'nin nisin aktivitesi üzerinde koruyucu etkisi gözlenmiştir. Tuz ve nisinin RTE gıdalarda kimyasal olarak eş zamanlı kullanımından önce bu konu araştırmacılar ve gıda işleyicileri tarafından dikkate alınmalıdır. Bu çalışmada kullanılan olasılıksal model yüksek uyum göstermiştir ve *L. monocytogenes* suşlarının gelişme limitlerini %91'in üzerinde uyumla lojistik regresyona dayalı bir matematiksel model ile belirlemek mümkün olmuştur.

h. Sabit bir KCl ve başlangıç suş konsantrasyonunda sıvı besiyerinde 8 hafta sonundaki gelişme olasılıklarını göstermek amacıyla yapılan simülasyonlara göre sıcaklık arttıkça suşlar arası farkında arttığı görülürken, en yüksek gelişme olasılığı yine *L. monocytogenes* 120-3P suşunda, en düşük gelişme olasılığı ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda görülmüştür. Sıcaklık yükseldikçe tüm suşların gelişme olasılığının arttığı, nisin konsantrasyonu yükseldiğinde ise tüm suşların gelişme olasılığının azaldığı görülmüştür.

i. Sabit bir potasyum sorbat ve başlangıç suş konsantrasyonunda sıvı besiyerinde 8 hafta sonundaki gelişme olasılıkları simülasyonunda en yüksek gelişme olasılığı diğer tuzların aksine *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunda görülürken en düşük gelişme olasılığı da *L. monocytogenes* 120-3P suşunda görülmüştür. Ayrıca diğer

tuzlarda görülen suşlar arası farkın sıcaklıkla artışı potasyum sorbat tuzunda görülmemiş ve suşlar arası fark potasyum sorbat kullanımında değişmemiştir. Sıcaklık yükseldikçe yine tüm suşların gelişme olasılığı artmıştır. Nisin konsantrasyonu azaldıkça tüm suşların gelişme olasılığı artmıştır.

j. Sıvı besiyerinde yaptığımız modelleme çalışmasının gıda ortamında validasyonunu göstermek amacıyla UHT süt ve ev yapımı katkı maddesi içermeyen et suyunda %1,5 KCl veya %0,125 $C_6H_7KO_2$ ilavesi ile 25 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL, ve 250 µg/mL nisin konsantrasyonlarının gelişme üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak 3 *L. monocytogenes* suşunun (*L. monocytogenes* 120-3P, *L. monocytogenes* 137-3P ve *L. monocytogenes* ATCC 7644) 10^6 KOB/mL başlangıç suş yoğunluğunda 8°C ve 12°C sıcaklıklarda 2 aylık inkübasyonu süresince elde edilen veriler değerlendirilmiş ve gelişme olasılığı hesaplanmıştır. Böylelikle sıvı besiyerinde oluşturmuş olduğumuz modellerin yine sıvı gıdalarda (süt ve et suyu) validasyonu yapılmıştır. UHT sütte tahmin başarı oranı %46 çıkarken, et suyunda ise %73 tahmin başarısı elde edilmiştir. Besiyerinde elde edilen sonuçlara göre daha düşük tahmin oranı göstermesi besiyeri ile gıda bileşenlerinin olası farklılığından kaynaklı olabilir.

k. Bu çalışmada kullanılan olasılıksal modeller yüksek uyum göstermiş ve böylece *L. monocytogenes*'in gelişme sınırlarını doğru bir şekilde belirlemek mümkün olmuştur. Sıvı besiyerinde alınan bu sonuçlar gelişme sınırlarının hızlı bir tahminini sunabilir, ancak gerçek bir gıda sisteminde sonuçlardan sapmalar görülebilmektedir.

l. Matematiksel gelişme/gelişmeme modelleri, gıda güvenliği için uygulanan engellerin etkilerini ve birbirleriyle olan etkileşimlerini öngörebilmek için yüksek uyum oranıyla kullanılabilir. Gelişme/gelişmeme modelleri, mikrobiyal gelişmenin meydana gelme olasılığını ölçer ve gelişmeyi önleyen faktör kombinasyonlarını tanımlar. Böylece daha güvenli gıda üretimi ve daha gerçekçi risk tahminleri için gerekli süreçlerin geliştirilmesinde faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

Aaliya, B., Sunooj, K. V., Navaf, M., Akhila, P. P., Sudheesh, C., Mir, S. A., Sabu, S., Sasidharan, A., Hlaing, M. T. ve George, J. 2021. Recent trends in bacterial decontamination of food products by hurdle technology: A synergistic approach using thermal and non-thermal processing techniques. Food Research International, 147, 110514.

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. ve Hosseini, H. 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Food Control, 35(1), 177-183.

Ačai, P., Valík, Ľ. ve Medveďová, A. 2021. One-and two-step kinetic data analysis applied for single and co-culture growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and Lactic Acid Bacteria in milk. Applied Sciences, 11(18), 8673.

Aelenei, P., Luca, S. V., Horhogea, C. E., Rimbu, C. M., Dimitriu, G., Macovei, I., Silion, M., Aprotosoaie, A. C. ve Miron, A. 2019. Morus alba leaf extract: Metabolite profiling and interactions with antibiotics against *Staphylococcus* spp. including MRSA. Phytochemistry Letters, 31, 217-224.

Akan, F. 2022. Etlik piliçlerde canlı ağırlık artışının doğrusal olmayan büyüme modelleri ile karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

Akritidou, T., Akkermans, S., Smet, C., de Mey, F. ve Van Impe, J. F. 2023. Influence of hurdle technology on foodborne pathogen survival in the human gastrointestinal tract. Microorganisms, 11(2), 405.

Amajoud, N., Leclercq, A., Soriano, J. M., Bracq-Dieye, H., El Maadoudi, M., Senhaji, N. S., Kounnoun, A., Moura, A., Lecuit, M. ve Abrini, J. 2018. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. Food Control, 84, 436-441.

Anonymous. 2011. Web Sitesi: https://www.fsai.ie/search-results.html?searchString=*Listeria*%20monocytogenes%20-%20FSAI Erişim Tarihi: 15.01.2023

Anonymous. 2019. *Listeria monocytogenes* Limits in Ready-to-Eat Food Food Safety Schemes Manual, Appendix 2, Web Sitesi: https://www.foodauthority.nsw.gov.au/sites/default/files/2020-01/fssm_*Listeria*_limits_app2.pdf Erişim Tarihi: 15.01.2023.

Anonymous. 2020. Web Sitesi: https://lpsn.dsmz.de/search?word=*Listeria* Erişim Tarihi: 20.08.2022.

Anonymous. 2023. Web Sitesi: https://www.cdc.gov/*Listeria*/outbreaks/index.html Erişim Tarihi: 20.02.2023.

Ariafar MN, 2015. *Salmonella enterica* serovar *Virchow* suşlarında besinsel ve çevresel koşulların selüloz üretimi, kıvrımlı fimbriya sentezi ve biyofilm oluşumu üzerine etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji, Ankara.

Baños, A., García-López, J. D., Núñez, C., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. ve Valdivia, E. 2016. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. LWT-Food Science and Technology, 66, 672-677.

Batt, C.A. 2014a. *LISTERIA*, Introduction, Editor(s): Batt, C. A. ve Tortorello, M. L., Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, Pages 466-469, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00186-5.

Batt, C. A. 2014b. *LISTERIA*, *Listeria monocytogenes*. Editor(s): Batt, C. A. ve Tortorello, M. L., Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, Pages 490-493, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00191-9.

Baydemir, M. B. 2014. Lojistik regresyon analizi üzerine bir inceleme, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ekonometri Ana Bilim Dalı, 83, Malatya.

Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Schvartzman, S., Jordan, K. ve Skandamis, P. N. 2011. Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. International Journal of Food Microbiology, 145, S53-S60.

Bolívar, A., Tarlak, F., Costa, J. C. C. P., Cejudo-Gómez, M., Bover-Cid, S., Zurera, G. ve Pérez-Rodríguez, F. 2021. A new expanded modelling approach for investigating the bioprotective capacity of *Latilactobacillus sakei* CTC494 against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat fish products. Food Research International, 147, 110545.

Bolton, L. F. ve Frank, J. F. 1999. Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. Journal of Food Protection, 62(6), 601-609.

Borena, B. M., Dilgasa, L., Gebremedhin, E. Z., Sarba, E. J., Marami, L. M., Kelbesa, K. A. ve Tadese, N. D. 2022. *Listeria* species occurrence and associated risk factors and antibiogram of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products in Ambo, Holeta, and Bako towns, Oromia Regional State, Ethiopia. Veterinary Medicine International, 2022.

Bouttefroy, A., Mansour, M., Linder, M. ve Milliere, J. B. 2000. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth

by an experimental design approach. International Journal of Food Microbiology, 54(1-2), 109-115.

Boziaris, I. S. ve Nychas, G. J. 2006. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. Food Microbiology, 23(8), 779-784.

Boziaris, I. S., Skandamis, P. N., Anastasiadi, M. ve Nychas, G. J. 2007. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. Journal of Applied Microbiology, 102(3), 796-805.

Buzrul, S. 2014. Hayvansal gıdalarda bulunan *Listeria monocytogenes*'in yüksek hidrostatik basınç altında yaşam eğrilerinin tanımlanması üzerine bir derleme. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20(2), 321-327.

Buzrul, S. 2022. The Weibull model for microbial inactivation. Food Engineering Reviews, 14(1), 45-61.

Carlin, C. R., Liao, J., Weller, D., Guo, X., Orsi, R. ve Wiedmann, M. 2021. *Listeria* cossartiae sp. nov., *Listeria* immobilis sp. nov., *Listeria* portnoyi sp. nov. and *Listeria* rustica sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(5).

Chen, X., Zhang, X., Meng, R., Zhao, Z., Liu, Z., Zhao, X., Shi, C. ve Guo, N. 2016. Efficacy of a combination of nisin and p-Anisaldehyde against *Listeria monocytogenes*. Food Control, 66, 100-106.

Çatal, B. 2021, Lojistik regresyon analizi ve sağlık alanında bir uygulama, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Isparta.

Çığşar, B. 2022, Büyüme modellerine yaklaşımlar ve yeni büyüme modelleri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstatistik Anabilim Dalı, Adana.

Çokluk, Ö. 2010. Lojistik regresyon analizi: Kavram ve uygulama. Kuram ve Uygulamada Eğitim Bilimleri, 10(3), 1357-1407.

da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., da Silveira, N. P. ve Brandelli, A. 2010. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. Food Microbiology, 27(1), 175-178.

Dalgaard, P. ve Mejlholm, O. 2019. Modeling growth of *Listeria* and lactic acid bacteria in food environments. Foodborne Bacterial Pathogens: Methods and Protocols, 247-264.

Falardeau, J., Trmčić, A. ve Wang, S. 2021. The occurrence, growth, and biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fresh and surface-ripened soft and semisoft cheeses. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20(4), 4019-4048.

FAO and WHO. 2021. Microbiological risk assessment- Guidance for food. Microbiological Risk Assessment Series, 288 pp, No. 36. Rome, Italy. https://doi.org/10.4060/cb5006en.

Gallo, L. I., Pilosof, A. M. R. ve Jagus, R. J. 2007. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. Food Control, 18(9), 1086-1092.

Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C. ve Degraeve, P. 2016. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(8), 1262-1274.

Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J. J., Rota, C., Ariño, A. ve Yangüela, J. 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. Food Microbiology, 42, 61-65.

Gray, J. A., Chandry, P. S., Kaur, M., Kocharunchitt, C., Bowman, J. P. ve Fox, E. M. 2018. Novel biocontrol methods for *Listeria monocytogenes* biofilms in food production facilities. Frontiers in Microbiology, 9, 605.

Güneş-Altuntaş, E. 2014. Engeller teknolojisinde bakteriyosinlerin kullanımı. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji, 71(3).

Gwak, E., Oh, M. H., Park, B. Y., Lee, H., Lee, S., Ha, J., Lee, J., Kim, S., Choi, K. H. ve Yoon, Y. 2015. Probabilistic models to predict *Listeria monocytogenes* growth at low concentrations of $NaNO_2$ and NaCl in frankfurters. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 35(6), 815.

Gysemans, K. P., Bernaerts, K. vermeulen, A., Geeraerd, A. H., Debevere, J., Devlieghere, F. ve Van Impe, J. F. 2007. Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 114(3), 316-331.

Hu, L., Dong, Q., Li, Z., Ma, Y., Aslam, M. Z. ve Liu, Y. 2022. Modelling the adhesion and biofilm formation boundary of *Listeria monocytogenes* ST9. Foods, 11(13), 1940.

Huang, L., Jia, Z. ve Hwang, C. A. 2022. Growth and No-Growth boundary of *Listeria monocytogenes* in beef–A logistic modeling. Food Research International, 152, 110919.

Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J. ve Karam, L. 2020. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. Journal of Dairy Science, 103(3), 2041-2052.

Jamali, H., Chai, L. C. ve Thong, K. L. 2013a. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. Food Control, 32(1), 19-24.

Jamali, H., Radmehr, B. ve Thong, K. L. 2013b. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. Food Control, 34(1), 121-125.

Jamshidi, A. ve Zeinali, T. 2019. Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. International Journal of Food Science, 2019.

Jang, W. J., Hasan, M. T., Park, S. Y., Heo, Y. J., Kim, D. P. ve Lee, J. M. 2023. Synergy of nisin z and sodium chloride in the inhibition of food-borne pathogens and quality control of aquatic foods. Journal of Aquatic Food Product Technology, 1-10.

Jia, Z., Bai, W., Li, X., Fang, T. ve Li, C. 2020. Assessing the growth of *Listeria monocytogenes* in salmon with or without the competition of background microflora--A one-step kinetic analysis. Food Control, 114, 107139.

Jia, Z., Huang, L., Wei, Z., Yao, Y., Fang, T. ve Li, C. 2021. Dynamic kinetic analysis of growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized cow milk. Journal of Dairy Science, 104(3), 2654-2667.

Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H. ve Oh, D. H. 2017. Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety–A review. Food Control, 73, 1426-1444.

Khan, J. A., Rathore, R. S., Shaheen Khan, S. K., Hussain, F. M., ve Ahmad, I. 2016. Role of *Listeria monocytogenes* in human health: disadvantages and advantages. In The Handbook of Microbial Bioresources. (pp. 193-203). Wallingford UK: CABI. https://doi.org/10.1079/9781780645216.019.

Khanipour, E., Flint, S. H., McCarthy, O. J., Golding, M., Palmer, J., Ratkowsky, D. A., Ross, T. ve Tamplin, M. 2016a. Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). Food Control, 62, 32-43.

Khanipour, E., Flint, S. H., McCarthy, O. J., Palmer, J., Golding, M., Ratkowsky, D. A., Ross, T. ve Tamplin, M. 2016b. Modelling the combined effect of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in high moisture processed cheese analogue. International Dairy Journal, 57, 62-71.

Koutsoumanis, K. P. ve Sofos, J. N. 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 104(1), 83-91.

Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A. ve Sofos, J. N. 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. Food Microbiology, 21(4), 415-422.

Kowalska-Krochmal, B. ve Dudek-Wicher, R. 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. Pathogens, 10(2), 165.

Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N. ve Patel, S. 2019. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. Microbial Pathogenesis, 128, 171-177.

Lee, Y. J., Jung, B. S., Yoon, H. J., Kim, K. T., Paik, H. D. ve Lee, J. Y. 2014. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. Food Control, 44, 16-21.

Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., ... ve Sulakvelidze, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology, 69(8), 4519-4526.

Leylak, C. ve Buzrul, S. 2020. The combined effect of temperature, ph and lactose concentration on the growth probability of *Listeria innocua*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 10(3), 474-477.

Leylak, C., Yurdakul, M. ve Buzrul, S. 2020. Gıda bilimlerinde Excel kullanımı 1: Doğrusal regresyon. Food and Health, 6(3), 186-198.

Liu, H., Lu, L., Pan, Y., Sun, X., Hwang, C. A., Zhao, Y. ve Wu, V. C. 2015. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. Food Control, 52, 78-84.

López-Cuellar, M. D. R., Rodríguez-Hernández, A. I. ve Chavarría-Hernández, N. 2016. LAB bacteriocin applications in the last decade. Biotechnology ve Biotechnological Equipment, 30(6), 1039-1050.

Mansell P.D. 2022. Infectious Diseases: Listeriozis, Editor(s): McSweeney, P. L. H. ve McNamara, J. P., Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition), Academic Press, 2022, Pages 343-351, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00066-0.

McManamon, O., Kaupper, T., Scollard, J. ve Schmalenberger, A. 2019. Nisin application delays growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut iceberg lettuce in

modified atmosphere packaging, while the bacterial community structure changes within one week of storage. Postharvest Biology and Technology, 147, 185-195.

Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P. G., ... ve Ricke, S. C. 2012. A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52(8), 712-725.

Negash, A. W. ve Tsehai, B. A. 2020. Current applications of bacteriocin. International Journal of Microbiology, 2020.

Ngnitcho, P. F. K., Khan, I., Tango, C. N., Hussain, M. S. ve Oh, D. H. 2017. Inactivation of bacterial pathogens on lettuce, sprouts, and spinach using hurdle technology. Innovative Food Science ve Emerging Technologies, 43, 68-76.

O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P. ve Cotter, P. D. 2020. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. Current Opinion in Biotechnology, 61, 160-167.

Oladunjoye, A. O., Singh, S. ve Ijabadeniyi, O. A. 2016. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 on fresh-cut tomato (Lycopersicon esculentum) using nisin combined with organic acids. Food Science and Biotechnology, 25, 1491-1496.

Orsi, R. H. ve Wiedmann, M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(12), 5273-5287.

Osman, K. M., Samir, A., Abo-Shama, U. H., Mohamed, E. H., Orabi, A. ve Zolnikov, T. 2016. Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. BMC Microbiology, 16(1), 1-13.

Öksüz, H. B. ve Buzrul, S. 2021. Mikroorganizmaların büyüme eğrilerini tanımlamak için excel tabanlı, kullanıcı dostu, ücretsiz bir araç: ÖK-BUZ GRoFiT. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(3), 521-532.

Öncü, NA. 2012, Raf Ömrü Boyunca Sıcaklık Değişimlerine Maruz Kalan Kaymaklarda *L. monocytogenes*'in Gelişim Potansiyelinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programı, İstanbul.

Parvekar, P., Palaskar, J., Metgud, S., Maria, R. ve Dutta, S. 2020. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. Biomaterial Investigations in Dentistry, 7(1), 105-109.

Pietrysiak, E., Smith, S. ve Ganjyal, G. M. 2019. Food safety interventions to control *Listeria monocytogenes* in the fresh apple packing industry: a review. Comprehensive reviews in food science and food safety, 18(6), 1705-1726.

Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J. M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V. ve Vialette, M. 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Applied and Environmental Microbiology, 70(2), 1081-1087.

Polat, H. 2017. Lojistik regresyon analizi: sağlık verileri üzerine bir uygulama, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İşletme Anabilim Dalı, Rize.

Possas, A., Bonilla-Luque, O. M. ve Valero, A. 2021. From cheese-making to consumption: Exploring the microbial safety of cheeses through predictive microbiology models. Foods, 10(2), 355.

Rahman, M. S. 2015. Hurdle technology in food preservation. Minimally Processed Foods: Technologies for Safety, Quality, and Convenience, 17-33.

Ramires, T., Kleinubing, N. R., Iglesias, M. A., Vitola, H. R. S., Núncio, A. S. P., Kroning, I. S., Moreira, G. M. S. G., Fiorentini, A. M. ve da Silva, W. P. 2021. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. Food Research International, 140, 109871.

Ranadheera C. S., Prasanna P. H. P., Vidanarachchi J. K., McConchie R., Naumovski N., Mellor D. 2017. Chapter 12- Nanotechnology in Microbial Food Safety, Editor(s): Oprea, A. E. ve Grumezescu, A. M., Nanotechnology Applications in Food, Academic Press, Pages 245-265, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00012-1.

Rosshaug, P. S., Detmer, A., Ingmer, H. ve Larsen, M. H. 2012. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in soft blue-white cheese. Applied and Environmental Microbiology, 78(24), 8508-8514.

Rybicka, I., Gonçalves, A., Oliveira, H., Marques, A. ve Nunes, M. L. 2022. Salt reduction in seafood–A review. Food Control, 108809.

Schvartzman, M. S., Belessi, X., Butler, F., Skandamis, P. ve Jordan, K. 2010. Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese. Journal of Applied Microbiology, 109(5), 1790-1799.

Shen, J., Rump, L., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, X. ve Meng, J. 2013. Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. Food Microbiology, 35(1), 58-64.

Shi, Y., Tang, J., Yue, T., Rasco, B. ve Wang, S. 2015. Pasteurizing cold smoked salmon (Oncorhynchus nerka): Thermal inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Journal of Aquatic Food Product Technology, 24(7), 712-722.

Shrestha, S., Grieder, J. A., McMahon, D. J. ve Nummer, B. A. 2011. Survival of *Listeria monocytogenes* introduced as a post-aging contaminant during storage of low-salt Cheddar cheese at 4, 10, and 21 C. Journal of Dairy Science, 94(9), 4329-4335.

Silva-Angulo, A. B., Zanini, S. F., Rodrigo, D., Rosenthal, A. ve Martinez, A. 2014. Growth kinetics of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* under exposure to carvacrol and the occurrence of sublethal damage. Food Control, 37, 336-342.

Singh, S. ve Shalini, R. 2016. Effect of hurdle technology in food preservation: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(4), 641-649.

Skjerdal, T., Gangsei, L. E., Alvseike, O., Kausrud, K., De Cesare, A., Alexa, E. A., Alvarez-Ordóñez, A., Moen, L. H., Osland, A. M., From, C., Nordvik, B., Lindbäck, T., Kvello, J., Folgerø, B., Dommersnes, S. ve Hauge, S. J. 2021. Development and validation of a regression model for *Listeria monocytogenes* growth in roast beefs. Food Microbiology, 98, 103770.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. ve Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiology, 25(1), 120-127.

Soni, D. K., Singh, M., Singh, D. V. ve Dubey, S. K. 2014a. Virulence and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable and soil samples. BMC microbiology, 14(1), 1-10.

Soni, K. A., Shen, Q. ve Nannapaneni, R. 2014b. Reduction of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by bacteriophage P100, nisin and lauric arginate, singly or in combinations. International Journal of Food Science ve Technology, 49(8), 1918-1924.

Şenel, S. ve Alatlı, B. 2014. Lojistik regresyon analizinin kullanıldığı makaleler üzerine bir inceleme. Journal of Measurement and Evaluation in Education and Psychology, 5(1), 35-52.

Taner, Z. 2021. Çeşitli antimikrobiyal peptidlerin klinik önemi olan anaerop bakteriler üzerindeki etkinliğinin araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 150, İstanbul.

Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, F. ve Lu, Z. 2017. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. Food Control, 73, 704-711.

Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A. ve Ross, T. 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. Applied and Environmental Microbiology, 66(11), 4979-4987.

Tiwari, U., Walsh, D., Rivas, L., Jordan, K. ve Duffy, G. 2014. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. Food Control, 42, 248-256.

Tosun, M. N. 2022. Marullarda *Clostridium difficile* varlığı, yıkama solüsyonları ve modifiye atmosfer paketlemenin etkisinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 187, Çanakkale.

Townsend, A., Strawn, L. K., Chapman, B. J. ve Dunn, L. L. 2021. A systematic review of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* prevalence, persistence, and diversity throughout the fresh produce supply chain. Foods, 10(6), 1427.

Valero, A., Carrasco, E., Pérez-Rodriguez, F., García-Gimeno, R. M. ve Zurera, G. 2006. Growth/no growth model of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. European Food Research and Technology, 224, 91-100.

Valero, A., Hervás, C., García-Gimeno, R. M. ve Zurera, G. 2007. Product unit neural network models for predicting the growth limits of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology, 24(5), 452-464.

Vermeulen, A., Gysemans, K. P. M., Bernaerts, K., Geeraerd, A. H., Debevere, J., Devlieghere, F. ve Van Impe, J. F. 2009. Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. International Journal of Food Microbiology, 135(2), 83-89.

Wemmenhove, E., Wells-Bennik, M. H. J. ve Zwietering, M. H. 2021. A model to predict the fate of *Listeria monocytogenes* in different cheese types–A major role for undissociated lactic acid in addition to pH, water activity, and temperature. International Journal of Food Microbiology, 357, 109350.

Wu, M., Dong, Q., Song, X., Xu, L., Xia, X., Aslam, M. Z., Ma, Y., Qin, X., Wang, X., Liu, Y., Xu, B., Liu, H., Cai, H., Hirata, T. ve Li, Z. 2023. Effective combination of nisin and sesamol against *Listeria monocytogenes*. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie- Food Science and Technology, 176, 114546.

Wu, M., Ma, Y., Dou, X., Aslam, M. Z., Liu, Y., Xia, X., Yang, S., Wang, X., Qin, X., Hirata, T., Dong, Q. ve Li, Z. 2022. A review of potential antibacterial activities of nisin against *Listeria monocytogenes*: the combined use of nisin shows more advantages than single use. Food Research International, 112363.

Yamaki, S., Shirahama, S., Kobayashi, T., Kawai, Y. ve Yamazaki, K. 2015. Combined effect of nisin and commercial pectin-hydrolysate treatment on survival and growth of *Listeria monocytogenes* in soy-seasoned Salmon Roe products. Food Science and Technology Research, 21(5), 751-755.

Yehia, H. M., Ibraheim, S. M. ve Hassanein, W. A. 2016. Prevalence of *Listeria* species in some foods and their rapid identification. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15(5), 1047-1052.

Yoon, Y., Geornaras, I., Scanga, J. A., Belk, K. E., Smith, G. C., Kendall, P. A. ve Sofos, J. N. 2011. Probabilistic models for the prediction of target growth interfaces of *Listeria monocytogenes* on ham and turkey breast products. Journal of Food Science, 76(6), M450-M455.

Yüksel, F. N. 2012. Gıda kaynaklı *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında virülans faktörlerin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 116, Ankara.

Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. ve Podlasz, P. 2020. Virulence characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. Pathogens, 9(12), 1028.

Zhao, L., Chen, Y. ve Schaffner, D. W. 2001. Comparison of logistic regression and linear regression in modeling percentage data. Applied and Environmental Microbiology, 67(5), 2129-2135.